

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA KOSMAČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA KOSMAČ

**IZDELAVA PROTOKOLA ZA DOLOČANJE PORAZDELJEVANJA
UČINKOVIN IN METABOLITOV MED KRVNIMI CELICAMI IN PLAZMO**

**DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR DETERMINATION OF BLOOD CELL
TO PLASMA CONCENTRATION RATIO**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. Hematološke meritve sem izvajala v diagnostičnem laboratoriju Zdravstvenega doma za študente Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Tomažu Vovku za vso posredovano znanje, nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu in izdelavi magistrske naloge. Zahvala gre tudi strokovnima sodelavkama na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Nevenki Lilik in Greti Cof, ki sta mi s koristnimi napotki olajšali delo v laboratoriju.

Za prijaznost in ustrežljivost pri hematoloških meritvah se zahvaljujem vodji diagnostičnega laboratorija Zdravstvenega doma za študente Simoni Kuzma, dipl. ing. lab. biomed., in ostalim zaposlenim v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi sošolcem in prijateljem, ki so mi popestrili študijska leta. Nenazadnje se najlepše zahvaljujem svoji družini za vso podporo, spodbudo in usmerjanje.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Anita Kosmač

Ljubljana, 2017

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Članica magistrske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1. Terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin (TDM)	1
1.1.1. Določitev koncentracije učinkovine v biološkem materialu	1
1.1.2. Interpretacija rezultatov	2
1.2. TDM pri zdravljenju epilepsije	3
1.2.1. TDM in PEU prve generacije	3
1.2.2. TDM in novejšje generacije PEU	4
1.3. Metoda posušenih krvnih madežev	5
1.3.1. Prednosti posušenih krvnih madežev	6
1.3.2. Slabosti posušenih krvnih madežev	6
1.3.3. Vzorčenje pri DBS	7
1.3.4. Primerjava krvnih in plazemskih koncentracij analitov	8
1.4. Vpliv vrednosti hematokrita	10
1.4.1. Vloga hematokrita pri DBS	10
1.4.2. Priprava krvi z različnimi vrednostmi hematokrita	10
1.4.3. Merjenje hematokrita v krvi in posušenih lisah	11
1.5. Hemoliza	11
1.5.1. Hemoliza pri določevanju porazdeljevanja učinkovine v celice in plazmo	12
1.5.2. Kvantitativno vrednotenje hemolize	12
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI	14
3.1. Biološki vzorci	14
3.2. Standardi	14
3.3. Reagenti in topila	14
3.4. Naprave in pribor	15
4 METODE	17
4.1. Analizni metodi	17
4.1.1. Analizna metoda za določanje koncentracij PEU v plazmi	17
4.1.2. Analizna metoda za določanje koncentracij PEU v DBS	19
4.2. Metoda za določanje hemoglobina v plazmi	22
4.3. Meritve hematokrita	24
4.4. Priprava krvi z različnimi hematokriti	25

4.4.1. Prvi postopek – dodajanje in odvzemanje plazme	25
4.4.2. Drugi postopek – pipetiranje krvnih celic in plazme	25
4.5. Vpliv časa inkubacije na hemolizo	26
4.6. Vpliv topila na hemolizo	27
4.7. Vpliv učinkovine na hemolizo	27
4.7.1. Priprava osnovnih in delovnih raztopin	28
4.7.2. Priprava obogatenih krvnih vzorcev	28
4.8. Določitev optimalnega inkubacijskega časa za vzpostavitev ravnotežja	29
4.8.1. Priprava osnovnih in delovnih raztopin	29
4.8.2. Priprava obogatenih krvnih vzorcev	30
4.9. Določitev porazdelitvenih koeficientov K in R.....	31
4.9.1. Priprava obogatenih krvnih vzorcev	31
4.9.2. Analiza plazemskih in DBS vzorcev.....	32
4.10. Statistična analiza podatkov	32
5 REZULTATI.....	34
5.1. Meritve hemoglobina v plazmi	34
5.2. Priprava krvi z različnimi hematokriti.....	35
5.3. Vpliv časa inkubacije na točnost meritev HT	36
5.4. Vpliv topila na točnost meritev HT in na hemolizo	37
5.4.1. Vpliv topila na točnosti meritev HT.....	37
5.4.2. Vpliv topila na hemolizo	37
5.4.3. Vpliv časa na hemolizo	39
5.5. Vpliv učinkovine na točnost meritev HT in na hemolizo	40
5.6. Določitev optimalnega inkubacijskega časa za vzpostavitev ravnotežja	41
5.7. Določitev porazdelitvenih koeficientov K in R.....	44
5.7.1. Karbamazepin.....	45
5.7.2. Epokarbamazepin	45
5.7.3. Likarbazepin.....	46
5.7.4. Fenitoin.....	47
5.7.5. Lamotrigin.....	48
5.7.6. Zonisamid.....	49
6 RAZPRAVA.....	50
6.1. Meritve hemoglobina v plazmi	50
6.2. Meritve hematokrita.....	50

6.3. Primerjava postopkov priprave krvi	51
6.4. Vpliv časa inkubacije na hemolizo	51
6.5. Vpliv topila na hemolizo.....	51
6.6 Vpliv učinkovine na hemolizo	52
6.7. Čas inkubacije do vzpostavitve ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo... 53	
6.8. Določitev porazdelitvenih koeficientov K in R.....	54
7 SKLEP	57
8 LITERATURA	59

Kazalo preglednic

Preglednica I: Primernost novejših PEU za uporabo pri TDM. Povzeto po Krasowski (10) 4	
Preglednica II: Vrednosti K in R za PEU in metabolite (12,23)	9
Preglednica III: Interval HT pri različnem spolu in starosti.....	10
Preglednica IV: Priprava delovnih raztopin in kalibratorjev za umeritveno krivuljo.	17
Preglednica V: Program gradientne elucije za kromatografsko ločbo 6 PEU.....	19
Preglednica VI: Priprava delovnih raztopin za umeritveno krivuljo DBS	20
Preglednica VII: Priprava raztopin za krvne kalibratorje.....	20
Preglednici VIII in IX: Priprava standardov hemina za umeritveni krivulji v koncentraciji od 20-200 mg/dl (levo) in od 2-20 mg/dl (desno).	23
Preglednica X: Primer priprave krvi po prvem postopku.....	25
Preglednica XI: Shema priprave krvnih vzorcev po drugem postopku.....	26
Preglednica XII: Priprava krvnih vzorcev z dodanim topilom.....	27
Preglednica XIII: Izračun koncentracij delovne raztopine učinkovin za dodajanje h krvnim vzorcem (<i>CDR</i>).....	28
Preglednica XIV: Priprava delovnih raztopin VPA in CBZ.....	28
Preglednica XV: Izračun koncentracij učinkovin za dodajanje h krvnim vzorcem.	29
Preglednica XVI: priprava delovnih raztopin CBZ, EpoCBZ in LiCBZ, PHT, LTG in ZON.	30
Preglednica XVII: Izračun koncentracij delovnih raztopin za dodajanje h krvnim vzorcem.	31
Preglednica XVIII: Priprava delovnih raztopin za dodajanje h krvnim vzorcem.	31
Preglednica XIX: CBZ - Rezultati določitve K in R.....	45

Preglednica XX: CBZ - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.	45
Preglednica XXI: EpoCBZ - Rezultati določitve K in R.....	46
Preglednica XXII: EpoCBZ - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.....	46
Preglednica XXIII: LiCBZ - Rezultati določitve K in R.....	46
Preglednica XXIV: LiCBZ - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.....	47
Preglednica XXV: PHT - Rezultati določitve K in R.....	47
Preglednica XXVI: PHT - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.....	48
Preglednica XXVII: LTG - Rezultati določitve K in R.....	48
Preglednica XXVIII: LTG - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.....	48
Preglednica XXIX: ZON - Rezultati določitve K in R.....	49
Preglednica XXX: ZON - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.....	49
Preglednica XXXI: Primerjava postopkov priprave krvi z dodajanjem in odvzemanjem plazme.....	51
Preglednica XXXII: Primerjava vrednosti iz literature (12,23) in naših rezultatov	54

Kazalo slik

Slika 1: Umeritvena krivulja za hemin v območju od 2-20 mg/dl	34
Slika 2: Umeritvena krivulja za hemin v območju od 20-200 mg/dl	34
Slika 3: Primerjava točnosti dveh postopkov priprave krvi	35
Slika 4: Passing Bablok regresija in Bland Altmanov graf meritev vzorcev z različnim HT pripravljenih s prvim postopkom.....	36
Slika 5: Točnost meritev HT v odvisnosti od časa	36
Slika 6: Primerjava točnosti meritev HT ob dodatku 1 %, 3 % in 5 % topila.....	37
Slika 7: Primerjava hemolize ob dodatku topila.....	38
Slika 8: Vpliv deleža topila na hemolizo.....	38
Slika 9: Vpliv hematokrita na hemolizo	39

Slika 10: Vpliv časa inkubacije na hemolizo v kontrolni skupini	39
Slika 11: Vpliv učinkovine na točnost meritev HT	40
Slika 12: Vpliv učinkovine na hemolizo	40
Slika 13: Vpliv vrednosti HT na hemolizo.....	41
Slika 14: Vpliv časa inkubacije CBZ v krvi na koncentracijo CBZ v plazmi.....	41
Slika 15: Vpliv časa inkubacije EpoCBZ v krvi na koncentracijo EpoCBZ v plazmi.....	42
Slika 16: Vpliv časa inkubacije LiCBZ v krvi na koncentracijo LiCBZ v plazmi.....	42
Slika 17: Vpliv časa inkubacije PHT v krvi na koncentracijo PHT v plazmi.	43
Slika 18: Vpliv časa inkubacije LTG v krvi na koncentracijo LTG v plazmi.....	43
Slika 19: Vpliv časa inkubacije ZON v krvi na koncentracijo ZON v plazmi.....	44

POVZETEK

Metoda posušenih krvnih madežev (DBS) je alternativna metoda vzorčenja in določanja koncentracij spojin v majhnem volumnu krvi, ki se vse bolj uveljavlja pri terapevtskem spremljanju koncentracij učinkovin (TDM). Ker so za namene TDM referenčne in terapevtske vrednosti večinoma določene za plazemske vzorce, pri DBS pa se koncentracija učinkovine določa v polni krvi, smo v okviru magistrske naloge izdelali protokol za pretvorbo izmerjenih koncentracij učinkovin iz DBS v plazemske koncentracije.

Pri tem smo se osredotočili na kritične korake pri pripravi krvnih vzorcev, ki bi lahko vplivali na vrednost hematokrita in na hemolizo ter povzročili, da so pretvorjene koncentracije netočne. Vrednosti HT smo merili na hematološkem aparatu, hemolizo smo določali s spektrofotometrično meritvijo hemoglobina v plazmi. Preverjali smo ustreznost postopkov priprave krvnih vzorcev z različnimi hematokriti (HT) in ugotovili, da je najprimernejši postopek z dodajanjem in odvzemanjem plazme. Pri vplivu časa inkubacije na hemolizo smo ugotovili, da v časovnih točkah od 0 do 120 minut, čas ni imel vpliva. Pri vrednotenju vpliva dodanega topila metanola in acetonitrila v deležih 1, 3 in 5 % h krvnim vzorcem smo opazili, da sta acetonitril ob dodatku v 3 in 5 % in metanol pri dodatku v 5 % povzročila značilno večjo hemolizo kot kontrolna skupina. Preverili smo še vpliv učinkovine, tako da smo karbamazepin in valprojsko kislino krvnim vzorcem dodali v najvišji terapevtski koncentraciji. Pri teh koncentracijah še ni prišlo do značilno hemolize.

Ustreznost priprave obogatene krvi smo preverili pri karbamazepinu (CBZ), epokarbamazepinu (EpoCBZ), likarbazepinu (LiCBZ), fenitoinu (PHT), lamotriginu (LTG) in zonisamidu (ZON). Koncentracije analitov v DBS in v plazmi smo določali s pomočjo validiranih metod in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Z meritvami koncentracij analitov v plazmi, smo določili čas inkubacije do vzpostavitve ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo, ki je bil za obravnavane analite le nekaj minut. Nato smo z merjenjem koncentracij analitov v DBS in plazmi izračunali porazdelitvena koeficienta K in R , ki določata porazdeljevanje med plazmo in krvnimi celicami (K) oz. krvjo (R). Pri CBZ, LiCBZ, LTG in ZON smo dobili dobro ujemanje med izračunanimi in literaturnimi vrednostmi. Odvisnost R in K od HT smo opazili pri LiCBZ, EpoCBZ, LTG in ZON, pri katerem sta koeficienta odvisna še od koncentracije analita.

Ključne besede: terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin, posušeni krvni madeži, hematokrit, hemoliza, porazdelitvena koeficienta, protiepileptične učinkovine

ABSTRACT

Dried Blood Spot (DBS) is an alternative method for blood sampling and drug concentration determination in small blood volume with an increasing role in therapeutic drug monitoring (TDM). The important restriction of its use for TDM is the establishment of reference ranges for plasma samples, whereas the drug concentrations in DBS are determined in whole blood. Therefore, we developed the protocol for determination of blood cell to plasma concentration ratio that helps us find a correlation between concentrations in DBS and plasma.

We focused on the critical factors of preparing blood samples, hematocrit value (HT) and hemolysis, which may influence the accuracy of blood cell to plasma concentration ratio. The target HT was measured using a hematology analyzer and hemolysis was determined with spectrophotometric measurements of hemoglobin in plasma. We compared two hematocrit preparation procedures. The preparation of target HT with adding or removing plasma was considered the most appropriate. Investigating the influence of incubation time on hemolysis, we did not notice any changes in the period from zero to 120 minutes. We analyzed the effect of added solution to the blood samples, with methanol and acetonitrile in 1, 3 and 5 %. There was a significant hemolysis when the acetonitrile in 3 and 5 % and methanol in 5 % were added. To investigate the influence of drugs on hemolysis, we prepared the solutions of valproic acid and carbamazepine in their highest therapeutic values. At these concentrations, no difference in hemolysis was observed.

We used protocol to provide partition coefficients for carbamazepine (CBZ), epocarbamazepine (EpoCBZ), licarbazepine (LiCBZ), phenytoine (PHT), lamotrigine (LTG) and zonisamide (ZON). The measurements of plasma and DBS concentrations were performed using validated methods and high-pressure liquid chromatography. We determined the incubation time of drugs to partition between blood cells and plasma, which was a few minutes. Considering all the critical steps, we prepared blood samples with added analyte and measured concentrations in DBS and plasma. From results, we calculated the coefficients that determine the partition of drugs between plasma and blood cells (K) or blood (R). We noticed good correlation of calculated coefficients and literature values for CBZ, LiCBZ, LTG and ZON. Values R and K of analytes LiCBZ, EpoCBZ, LTG and ZON were influenced by HT, in the case of ZON also by concentration of analyte.

Key words: therapeutic drug monitoring, dried blood spot, hematocrit, hemolysis, partition coefficients, antiepileptic drugs

Seznam okrajšav

AcN	acetonitril
AHD	alkalni reagent za pretvorbo hemoglobina v hematin (<i>Alkaline hematin detergent</i>)
C_B	koncentracija analita v krvi
C_{BC}	koncentracija analita v krvnih celicah
C_{DR}	koncentracija delovne raztopine
$C_{Hb\ cel.}$	celokupna koncentracija hemoglobina v krvi
$C_{Hb\ pl.}$	koncentracija hemoglobina v plazmi
C_{PL}	koncentracija analita v plazmi
CBZ	karbamazepin
CYP	citokrom P-oksido-reduktaze
DBS	posušeni krvni madeži (<i>dried blood spots</i>)
DR	delovna raztopina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EpoCBZ	epokarbamazepin
FA	mravljinčna kislina (<i>formic acid</i>)
g	težni pospešek
Hb	hemoglobin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HT	hematokrit
IS	interni standard
IZ	interval zaupanja
LC MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masnim spektrometrom
LiCBZ	likarbazepin
LTG	lamotrigin
K oz. $K_{BC/PL}$	porazdelitveni koeficient med krvnimi celicami in plazmo
KF	kloramfenikol
MW	molekulska masa (<i>molecular weight</i>)
MF	mobilna faza

MeOH	metanol
MTS	(3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazol
OR	osnovna raztopina
PB regresija	Passing-Bablok regresija
PEU	protiepileptična učinkovina
PHT	fenitoin
R oz. $R_{B/PL}$	porazdelitveni koeficient med krvjo in plazmo
rpm	obrati na minuto (<i>revolutions per minute</i>)
RSD	relativna standardna deviacija
ST	standard
T	temperatura
TDM	spremljanje koncentracije učinkovine (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
UZ kadička	ultrazvočna kadička
V	volumen
V_B	volumen krvi
V_{BC}	volumen krvnih celic
V_{PL}	volumen plazme
v/v	razmerje volumnov
VAMS	volumetrični absorptivni mikrovzorčevalnik (<i>volumetric absorptive microsampler</i>)
VPA	valprojska kislina
ZON	zonisamid

1 UVOD

1.1. Terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin (TDM)

Terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin je klinična metoda za merjenje koncentracij učinkovin v bioloških vzorcih, z namenom individualnega prilagajanja terapije ter boljše oskrbe pacienta. TDM sloni na spoznanju, da farmakološki učinek pri nekaterih učinkovinah boljše korelira s koncentracijo učinkovine v biološkem vzorcu, kot s predpisanim odmerkom. Posledično lahko z merjenjem koncentracij v biološkem vzorcu boljše predvidimo terapevtske in/ali toksične učinke (1).

Spremljanje koncentracij učinkovin je priporočljivo za učinkovine pri katerih ni na voljo farmakodinamičnih kazalnikov, s katerimi bi lahko enostavno sledili poteku terapije. Pri nekaterih skupinah zdravil, kot so na primer antihipertenzivi in hipolipemiki, lahko z meritvijo krvnega tlaka oz. holesterola enostavno preverimo uspešnost terapije ter jo glede na učinek ustrezno prilagodimo. Ob odsotnosti enostavno določljivih farmakodinamičnih kazalnikov je eden od načinov spremljanja terapije merjenje koncentracij učinkovin v krvi. Za spremljanje koncentracij učinkovin v krvi morajo učinkovine izkazovati še druge značilnosti, kot so na primer ozko terapevtsko območje, nelinearna povezava med serumsko oz. krvno koncentracijo in odmerkom, nepredvidljiv metabolizem, povezava med plazemsko oz. serumsko koncentracijo in kliničnim učinkom ter znani toksični učinki. Učinkovine, ki so primerne za TDM, prihajajo iz skupin protiepileptičnih učinkovin (PEU), imunosupresivov, antidepresivov, antineoplastikov, antibiotikov in učinkovin za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni (1,2,3).

1.1.1. Določitev koncentracije učinkovine v biološkem materialu

TDM je multidisciplinarna metoda, ki je v grobem razdeljena na določitev koncentracije želenega analita v biološkem materialu in ustrezne interpretacije dobljenih rezultatov. Pri tem se prepletajo znanja različnih strok, zato je interdisciplinarno sodelovanje ključno za uspešno izvajanje TDM. Posledično je metoda cenovno in časovno precej potratna in je smiselno jasno določiti okoliščine v katerih se uvede TDM (2,4).

Okoliščine, pri katerih je koristno uvesti TDM, so naslednje (2):

- ko se želimo izogniti toksičnim učinkom zdravil (aminoglikozidi, ciklosporini),

- ob prilagoditvi odmerka pri učinkovinah z nelinearno farmakokinetiko,
- za ugotavljanje primernega začetnega odmerka (npr. fenitoin),
- ko želimo preveriti bolnikovo vodljivost,
- ko želimo preveriti učinkovitost zdravila med samim zdravljenjem (še posebej za profilaktična zdravila, kot so PEU in imunosupresorji),
- ko želimo odkriti vzroke za neuspešno terapijo (s pomočjo TDM razlikujemo med neučinkovito terapijo, slabo vodljivostjo in neželenimi učinki, ki prekrijejo osnovno bolezen).

Koncentracije učinkovin se določajo v plazmi, serumu, posušeni krvni madeži, solzah, slini, laseh in znoju. Med njimi je najpogosteje uporabljeno določanje v plazmi oz. serumu, kjer mora biti rokovanje s krvjo previdno, da ne povzročimo hemolize ali razpada učinkovine in metabolitov. Po končanem vzorčenju je potrebno komponento krvnih celic takoj ločiti od plazme oz. seruma ter vzorce pred analizo še ustrezno pripraviti. Pri tem je pomembno predvsem, da vzorce očistimo različnih proteinov, ki bi med detekcijo motili odziv želenih analitov. Za analizo imamo na voljo številne analizne metode, med katerimi je najpogosteje uporabljena kromatografska tekočinska metoda sklopljena z masnim spektrometrom (LC MS/MS). Odlikuje jo predvsem dobra specifičnost, nizka meja spodnje določljivosti analita ter hitrost (5,6).

1.1.2. Interpretacija rezultatov

Za lažjo interpretacijo izmerjene koncentracije je smiselno definirati referenčno in terapevtsko območje. Prvi izraz zajema koncentracijsko območje v katerem je za večino bolnikov zdravljenje najbolj učinkovito in varno. Terapevtsko območje pa označuje individualno območje v katerem je zdravljenje najbolj optimalno za posameznega bolnika. Tudi razlago meritev je potrebno prilagoditi posameznemu bolniku. Preden se lotimo prilagajanja terapije, je pomembno preveriti okoliščine odvzema, kot so pravilni čas vzorčenja, rokovanje z vzorci, bolnikovo stanje in pridružene sočasne terapije. Če na primer bolniku na terapiji s PEU izmerimo koncentracijo, ki je malenkost pod mejo referenčnega območja in le-ta nima napadov, potem je zdravljenje zanj uspešno in je prilagoditev terapije nepotrebna. Poleg tega, se pri TDM najpogosteje določa celokupna koncentracija učinkovine, ki je v plazmi oz. serumu prosta ali vezana na plazemske proteine. Za terapevtski učinek je odgovorna samo prosta oblika, njena koncentracija pa je odvisna od koncentracije

albumina, od izpodrivanja iz vezavnih mest proteinov z drugimi zdravili in od ledvične funkcije. Če se koncentracija proste oblika učinkovine, ki je močno vezana na plazemske proteine, poveča iz 10 % na 20 % je potrebno terapevtski odmerek prepoloviti, sicer bi lahko že prišlo do toksičnih učinkov (2,7).

1.2. TDM pri zdravljenju epilepsije

Zdravljenje epilepsije je bilo eno izmed prvih področij, za katere se je začelo uveljavljati spremljanje plazemskih koncentracij zdravil. Epilepsija je skupina možganskih motenj, pri kateri se značilno pojavljajo epileptični napadi. Epileptični napadi so prepoznani po nenadnih dolgotrajnih mišičnih krčih udov ali celega telesa, ritmičnega stresanja, avtomatskega vedenja, otrdelostjo ter izgubo zavesti. Poleg napadov se bolniki v mnogih primerih soočajo še z anksioznostjo, depresijo in samomorilskimi mislimi. S PEU želimo preprečiti nove epileptične napade in omogočiti kvalitetno življenje bolnikov brez hujših neželenih učinkov (8,9).

1.2.1. TDM in PEU prve generacije

Med PEU prve generacije sodijo: etosuksimid, fenitoin, fenobarbital, metilfenobarbital, primidon, klonazepam, karbamazepin in valprojska kislina. Fenitoin je prva PEU, za katero je bil uveden TDM. Njegova posebnost je izjemno ozko terapevtsko območje od 10-20 mg/L, pri čemer se že pri 30 mg/L pojavijo toksični neželeni učinki (8).

Večini PEU prve generacije je skupna velika inter-individualna variabilnost v farmakokinetiki, ki je posledica genetskih dejavnikov, oslABLJENE funkcije jeter in ledvic in interakcij z drugimi zdravili ter hrano. Karbamazepin, fenobarbital in fenitoin so substrati encimov citokrom P450, ki skrbijo za presnavljanje številnih učinkovin in so vir številnih interakcij med zdravili, zato je koncentracija le-teh v krvi nižja od pričakovane. Poleg tega se pri kronični uporabi karbamazepina pojavi avtoindukcija encima citokrom P450, zato je odmerek smiselno prilagajati skladno s povečanim metabolizmom. Valprojska kislina je inhibitor jetrnih presnovnih encimov, zato lahko krvna koncentracija drugih učinkovin, ki so substrati teh encimov, ob sočasni uporabi naraste. Bolniki na terapiji s PEU imajo pogosto tudi oslABLJENO funkcijo ledvic, kar se kaže v zapozneli farmakokinetiki in zmanjšanem očistku učinkovin (10).

Za valprojsko kislino, fenitoin, in fenobarbital je značilna močna, v več kot 80 %, vezava na plazemske albumine. Ob hipoalbumeniji, uremiji in prisotnosti snovi, ki PEU izpodrivajo iz vezavnih mest na proteinih, se delež vezave znatno spremeni, s čimer se poveča koncentracija proste oblike, ki je odgovorna za klinične učinke. Pri teh učinkovinah je v izogib neželenim učinkom smiselno spremljanje deleža proste oblike v krvi (8).

TDM protiepileptičnih učinkovin prve generacije je primeren tudi za ugotavljanje bolnikove vodljivosti, saj se pri kronični terapiji z neželenimi učinki in ob odsotnosti epileptičnih napadov zgodi, da bolnik neredno jemlje zdravila ali pa sploh opusti njihovo jemanje (10).

1.2.2. TDM in novejšje generacije PEU

Od leta 1993 je na ameriški in/ali evropski trg vstopilo 14 novih PEU, ki jih uvrščamo v drugo ali tretjo generacijo PEU. V primerjavi s starejšimi učinkovinami imajo novejšje v splošnem širše terapevtsko območje, manj interakcij z drugimi zdravili ter manj neželenih učinkov (11). Njihova primernost za uporabo TDM je za vsako učinkovino posebej podana v preglednici I (10).

Preglednica I: Primernost novejših PEU za uporabo TDM. Povzeto po Krasowski (10).

Učinkovina	Razlogi za uvedbo TDM	Razlogi za vprašljivo uporabnost TDM
Eslikarbazepin acetat	Avtoindukcija, v primeru ledvične insuficience	Prisotnost aktivnega metabolita, predvidljiva farmakokinetika
Felbamat	Spremenljiv metabolizem, potencialna toksičnost	Neznano koncentracija pri kateri pride do toksičnosti
Gabapentin	Spremenljiva absorpcija zaradi nasitljivosti aminokislinskih prenašalcev, pri okvari ledvic	Široko območje terapevtske učinkovitosti, majhna pojavnost toksičnosti
Lakozamid	Pri jetrni in ledvični okvari	Predvidljiva farmakokinetika, ni interakcij z drugimi zdravili
Lamotrigin	Spremenljiv metabolizem preko jetrnih encimov, interakcije z drugimi zdravili, toksičnost, uporaba v nosečnosti	/
Levetiracetam	Pri ledvični okvari	Široko območje terapevtske učinkovitosti, majhna pojavnost toksičnosti

Okskarbazepin	Spremenljiv metabolizem, določena toksična koncentracija	Aktiven metabolit monohidroksi derivat
Pregabalin	Spremenljiv metabolizem, pri jetrni okvari	Široko območje terapevtske učinkovitosti, majhna pojavnost toksičnosti, kratek razpolovni čas
Rufinamid	Spremenljiv metabolizem, interakcije z drugimi zdravili, pri jetrni okvari	/
Stripentol	Obsežen učinek metabolizma prvega prehoda, velik delež vezave na serumske proteine, kinetika izločanja 0. reda	Vezava na serumske proteine oteži meritve celokupne koncentracije učinkovine.
Tiagabin	vezava na serumske proteine, interakcije z drugimi zdravili, pri jetrni okvari	Vezava na serumske proteine oteži meritve celokupne koncentracije učinkovine.
Topiramat	Interakcije z drugimi zdravili, interindividualno variabilen metabolizem	/
Vigabatrin	Pri jetrni okvari	Slaba povezava med serumsko koncentracijo in učinkom
Zonisamid	Spremenljiv metabolizem, interakcije, določena toksična koncentracija	/

1.3. Metoda posušenih krvnih madežev

Metoda posušenih krvnih madežev angl. »*Dried Blood Spot*« (DBS) je relativno enostavna metoda vzorčenja majhnega volumna kapilarne krvi, ki jo največkrat odzamemo z vbodom v prst ali peto, čemur sledita nanos in sušenje krvnih kapljic na papirčkih DBS (12).

Princip DBS je leta 1963 prvič uporabil Robert Guthrie pri razvoju presejalnega testa za odkrivanje metabolične motnje fenilketonurije pri novorojenčkih (13). Metoda je iz logističnega, stroškovnega in praktičnega vidika predstavljala dobro alternativo klasičnim krvnim oz. plazemskim vzorcem. Kljub temu, se DBS nadalje ni hitro razvijal, saj je razvoj omejeval majhen volumen krvi za vzorčenje ter kompleksnost biološkega matriksa. Šele z

uveljavitvijo novejših analiznih naprav, ki omogočajo natančno in selektivno analizo vzorcev, se je metoda razširila na številna področja uporabe. DBS se danes izvaja pri presejalnih testih, terapevtskem spremljanju koncentracij učinkovin ter za namene farmakokinetičnih, toksikokinetičnih in metabolnih študij (14,15).

1.3.1. Prednosti posušenih krvnih madežev

Za namene TDM ima tehnika DBS nekaj pomembnih prednosti pred konvencionalnim vzorčenjem venske krvi iz komolčnega pregiba:

- *Enostavno in minimalno invazivno vzorčenje.* Bolniki si lahko doma sami odvzamejo kri z vbodom v prst in nanosom kapljic krvi na filter papir. S tem si prihranijo pot v bolnišnice ter čakanje na odvzem (16).
- *Majhen volumen vzorca.* Za klasični venski odvzem krvi je potrebnih nekaj ml krvi, pri DBS je volumen za vzorčenje petih kapljic krvi le približno 250 ul. Manjši volumen odvzete krvi je primeren za bolnike s pogostim merjenjem koncentracij učinkovin v krvi ter za novorojenčke, nosečnice in hudo bolne ljudi, pri katerih je iz etičnega vidika zaželen manjši volumen krvi za analizo (17).
- *Stabilnost preučevanih analitov.* Večina analitov je stabilnejša v DBS kot v plazemskih vzorcih, saj so v trdnem stanju encimi, ki skrbijo za razpad, manj aktivni. Vzorci so pri sobni temperaturi stabilni vsaj teden dni (18).
- *Enostavna obdelava, transport in shranjevanje vzorcev.* Postopki kot so centrifugiranje, ločevanje in zamrzovanje plazme, pri DBS niso potrebni. Po odvzemu in nanosu krvi na papirčke DBS je potrebno vzorce le posušiti in shraniti v nepredušno zaprte plastične vrečke z dodanim sušilnim sredstvom. Vzorce se lahko do analiznih laboratorijev pošlje z navadno pošto (17).

Zaradi enostavnega odvzema, obdelave, transporta in shranjevanja vzorca, je metoda DBS ugodna tudi iz ekonomskega vidika (18).

1.3.2. Slabosti posušenih krvnih madežev

- *Majhen volumen vzorca.* Zaradi majhnega volumna vzorca je omejeno število analiz, ki jih lahko naredimo. Potrebujemo bolj občutljive analizne naprave in tehnike, ki omogočajo hkratno analizo več analitov v enem vzorcu (16).

- *Možnost kontaminacije.* Vzorci se lahko med odvzemom kontaminirajo s snovmi v bližini (17).
- *Tehnika DBS ni primerna za določene analite.* Vzorci krvnih madežev vsebujejo krvne komponente, ki se lahko skupaj z analiti izločijo v ekstrakcijsko topilo in motijo analizo nekaterih učinkovin. Poleg tega lahko med sušenjem krvnih madežev pride do sprememb v biokemijski sestavi določenih molekul, kar vpliva na uspešnost ekstrakcije iz papirja DBS (16). Prav tako za tehniko DBS niso primerne hlapne in lahko vnetljive snovi (12).
- *Primerjava plazme in krvi.* Rezultati analiz DBS vzorcev predstavljajo koncentracijo učinkovin v celotni krvi in se razlikujejo od koncentracij merjenih v plazmi. Med koncentracijama sicer obstaja povezava, a je na voljo malo podatkov o kliničnih primerjavah koncentracij učinkovin v DBS in venskih vzorcih (12).
- *Homogenost lise in vpliv hematokrita.* Na nehomogenost lise vplivata vrsta papirja DBS ter vrednost hematokrita, kar se kaže v slabši točnosti in natančnosti meritev (19).

1.3.3. Vzorčenje pri DBS

Vzorčenje navadno izvajamo tako, da mesto odvzema očistimo in zbodemo s sterilno lanceto. Prvo kapljico krvi zavržemo, ostale pa naneseemo na označena mesta papirčka DBS. Krvne madeže nato posušimo pri sobni temperaturi. Vzorci morajo biti popolnoma suhi, da se v vlažnem okolju ne razvijejo bakterije ali plesni. DBS shranimo v plastične vrečke s sušilnim sredstvom ali pa jih takoj analiziramo. Za analizo je potrebno najprej analite ekstrahirati iz papirčka. Iz vzorcev DBS s posebno napravo (pečatom) izrežemo enega ali več diskov velikosti 2-8 mm. Diskom dodamo ekstrakcijsko topilo in interni standard, ekstrahiramo s pomočjo mešalnika ter centrifugiramo (18).

Pri metodi izrezovanja diskov lahko naletimo na težave, če lisa ni homogeno razporejena čez celotno območje. Odvisno od izbire papirčka DBS, analizirane spojine in vrednosti hematokrita, se lahko na lisi pojavijo različne koncentracije učinkovine, ki povzročijo, da rezultati analiz DBS vzorcev niso v dopustnem območju standardnega bioanalitskega odstopanja. Ena od predlaganih rešitev v izogib težavam s homogenostjo je analiza diska vsakič na istem mestu lise. Pri tem je problematično zagotoviti vedno enako mesto izrezovanja. Boljša rešitev je, da se analizira kar celotna lisa. S tem se sicer zaplete začetno vzorčenje, saj potrebujemo natančen volumen kapljice krvi, ki ga naneseemo na papir DBS, a so na trgu že posebni pripomočki, ki nam vzorčenje olajšajo. Gre za volumetrični

absorptivni mikrovzorčevalnik (VAMS), ki se uporablja za vzorčenje vedno enakega volumna krvi (10 μ l). VAMS je sestavljen iz plastičnega držala ter nastavka iz adsorptivnega polimera. V odvisnosti od lastnosti in količine adsorptivnega polimera, je določen volumen vzorca, ki se po principu kapilarnega dviga, zbere v nastavku naprave. Postopek vzorčenja poteka tako, da konico nastavka potopimo v kapljico krvi in počakamo nekaj sekund, da se celoten nastavek obarva rdeče. Nato vzorce posušimo na zraku do suhega, ekstrahiramo analite iz nastavka ter postopamo po enakem postopku kot pri DBS (20,21).

1.3.4. Primerjava krvnih in plazemskih koncentracij analitov

Za TDM se uporabljajo referenčne vrednosti, ki so navadno določene v plazmi ali serumu. Pri analizi DBS pa dobimo vrednosti, ki predstavljajo koncentracijo učinkovin v polni krvi. Da bi tehniko DBS lahko uporabili v klinični praksi za TDM, moramo poznati razmerje med koncentracijama v plazmi in DBS (12).

Učinkovina se porazdeljujejo med krvne celice in plazmo v koncentracijskem razmerju, ki ga določa koeficient $K_{BC/PL}$; $K_{BC/PL} = \frac{C_{BC}}{C_{PL}}$, pri čemur je C_{BC} koncentracija učinkovine v krvnih celicah in C_{PL} koncentracija učinkovine v plazmi. Neposredno primerjavo plazemskih in DBS vzorcev pa prikazuje porazdelitveni koeficient $R_{B/PL}$; $R_{B/PL} = \frac{C_B}{C_{PL}}$, pri čemur je C_B koncentracija učinkovine v polni krvi (12).

Porazdeljevanje učinkovine v krvi je odvisno od celične permeabilnosti in vezave učinkovine na plazemske proteine ali celične sestavine. Poleg tega na koeficienta $K_{BC/PL}$ in $R_{B/PL}$ vplivata tudi volumna plazme (V_{PL}) in krvnih celic (V_{BC}). Vrednost hematokrita (HT), ki je volumski delež krvnih celic, je zelo spremenljiva pri različnih populacijah, zato predstavlja glavno oviro pri pravilni pretvorbi koncentracij analitov iz analiz DBS. Koncentracijo učinkovine v polni krvi lahko predstavimo z enačbo 1:

$$C_B = \frac{(C_{PL} \cdot V_{PL} + C_{BC} \cdot V_{BC})}{V_B}$$

Enačba 1

V enačbi 1, lahko volumen plazme (V_{PL}) zapišemo s pomočjo HT in volumna krvi (V_B): $V_{PL} = V_B \cdot (1 - HT)$ ter po izpostavitvi vrednosti C_{PL} in uvedbi $K_{BC/PL}$, dobimo enačbo 2:

$$C_{PL} = \frac{C_B}{(1 - HT) + K_{BC/PL} \cdot HT}$$

Z uporabo enačbe 2 lahko s pomočjo poznanih vrednosti HT in porazdelitvenega koeficienta $K_{BC/PL}$ enostavno preračunamo vrednosti krvnih koncentracij, dobljenih z analizo DBS, v plazemske koncentracije. Kljub temu moramo pri primerjavi krvnih in plazemskih koncentracij upoštevati, da so vzorci krvi za DBS zbrani iz kapilarne krvi in se koncentracije učinkovin, vzorčene kmalu po aplikaciji zdravila, lahko razlikujeta v kapilarni in venski krvi (12).

Iz vrednosti koeficienta $R_{B/PL}$ lahko dobimo številne informacije. Za hidrofilne učinkovine, terapevtske proteine ter kisle učinkovine z visoko afiniteto do proteinov v plazmi, je vrednost koeficienta R nizka (0,5-0,6), saj se te snovi le minimalno porazdeljujejo v eritrocite. Krvne celice, v odvisnosti od vrednosti hematokrita, delujejo kot topilo in povzročijo, da so koncentracije učinkovin v DBS nižje od plazemskih. Če se vrednost R giblje okoli ena pomeni, da ZU prehajajo v krvne celice, a se na plazemske oz. celične proteine ne vežejo, zato je koncentracija v plazmi skoraj enaka koncentraciji učinkovin v polni krvi. Primer takšnih snovi so npr. aminoglikozidni antibiotiki, kofein in alkohol. Ko je R večji od 1,5, je koncentracija učinkovin v polni krvi mnogo večja od koncentracije v plazmi. Takrat se za TDM priporoča merjenje učinkovin v polni krvi, saj učinkovina prehaja in se kopiči v krvnih celicah. Vrednost R je pri teh snoveh večinoma spremenljiva in odvisna od saturacije vezavnih proteinov v celicah. Učinkovina zonisamid se tako pri nižjih koncentracijah kar 5-krat bolj porazdeljuje v polni krvi kot pri visokih koncentracijah. Merjenje v polni krvi je za te učinkovine primerno tudi zaradi možnosti hemolize pri odvzemu in rokovanju s krvjo. Koncentracija učinkovin z visoko afiniteto do krvnih celic se lahko v plazmi signifikantno spremeni že pri 0,5 % hemolizi (22). V preglednici II so prikazane vrednosti K in R za izbrane PEU in metabolite.

Preglednica II: Vrednosti K in R za PEU in metabolite (12,23)

Ime učinkovine ali metabolita	Vrednost K	Vrednost R
Valprojska kislina	0,042	0,64
Fenitoin	0,29	1,33
Karbamazepin	1,09	/
Likarbazepin	1,10	1,25
Lamotrigin	1,57	2,0
Topiramat	/	8 oz. 2*

Zonisamid	/	15 oz. 3*
-----------	---	-----------

* Pri učinkovinah, ki imajo visoko afiniteto do krvnih celic, se pri visokih koncentracijah učinkovine pojavi nasičenje, zato se razmerje zniža.

1.4. Vpliv vrednosti hematokrita

Hematokrit (HT) je relativni volumen krvnih celic v krvi, ki pod vplivom starosti in spola v normalnih situacijah variira v referenčnih območjih, ki so prikazani v preglednici III.

Preglednica III: Interval HT pri različnem spolu in starosti

	<i>Hematokrit</i>
<i>Ženske</i>	<i>36,1-44,3 %</i>
<i>Moški</i>	<i>40,7-50,3%</i>
<i>Otroci</i>	<i>32,0-42,0 %</i>
<i>Novorojenčki</i>	<i>45,0-61,0 %</i>

V posebnih okoliščinah vrednosti odstopajo. Hematokrit je lahko povišan ob dehidracijah, povečani diurezi, opeklinah in travmah, policitemiji ter na visokih nadmorskih višinah. Vrednost HT pa se zniža ob anemijah, nosečnosti in po akutni hemoragiji (24).

1.4.1. Vloga hematokrita pri DBS

Hematokrit predstavlja največjo težavo pri validaciji DBS rezultatov. Vrednost hematokrita vpliva na viskoznosti krvi, ki določa, kako se kri razširi na DBS papirčku. Bolj kot je kri viskozna, manjša je lisa krvi na papirčku ter obratno. Vrednost hematokrita in velikost lise sta v obratnem sorazmerju. Problem se pojavi, ko za analizo DBS iz lis izrežemo diske določene velikosti, ki vsebujejo večji ali manjši volumen krvi, odvisno od njene viskoznosti. Vrednost HT lahko vpliva tudi na porazdelitev analita po lisi in povzroči, da se koncentracije v središču krvnega madeža razlikujejo od koncentracij na obdobju. Nenazadnje ima HT vpliv tudi na uspešnost ekstrakcije učinkovin iz papirčka. Posledično se zaradi zapisanih vplivov opaža velika variabilnost med rezultati analiz, ki so včasih tudi izven bioanalitskih mej odstopanja. Vrednost hematokrita je pomembna tudi pri določanju razmerja koncentracij učinkovin v DBS in plazmi (25).

1.4.2. Priprava krvi z različnimi vrednostmi hematokrita

Za nadaljnji razvoj tehnike DBS ter določanje koeficienta porazdeljevanja učinkovin med krvne celice in plazmo je potrebno pripraviti kri z različnimi vrednosti HT, za kar obstajata dva postopka. Pri prvem postopku nekoagulirano kri centrifugiramo, ločimo plazmo od krvnih celic ter ju ponovno združimo v določenih volumnih za doseganje znane vrednosti HT. Drugi postopek se od prvega razlikuje po tem, da najprej v nekoagulirani krvi pomerimo HT in kri razdelimo po znanih volumnih. Nato kri centrifugiramo in na koncu vzorcem dodamo ali odvzamemo plazmo. Slabost slednjega postopka je ta, da je potrebno pred vsako pripravo krvi pomeriti hematokrit, a se pri tem izognemo težavnemu pipetiranju viskoznih krvnih celic. Pri prvem postopku se prav tako lahko zgodi, da po centrifugiranju v plasti krvnih celic ostane del plazme, ki vpliva na to, da želena vrednost HT ni dosežena (26).

1.4.3. Merjenje hematokrita v krvi in posušenih lisah

Vrednost hematokrita v krvi se lahko določa neposredno, s centrifugiranjem in sedimentacijo krvnih celic. Pri posredni metodi pa se uporabljajo krvni analizatorji. Ti vrednost hematokrita izračunajo iz števila rdečih krvnih celic, ki ga pomnožijo z njihovim povprečnim volumnom (27).

Določanje hematokrita v DBS se razvija šele v novejšem času z uporabo endogenih kazalnikov, ki morajo izpolnjevati vrsto zahtev. Kazalnik mora dobro korelirati s krvnimi celicami, torej se mora večinoma nahajati znotraj celic. Poleg tega mora biti univerzalen, kar pomeni da med različnimi posamezniki ni večjih razlik. Nenazadnje mora biti stabilen v svežem in nekaj dni starem vzorcu DBS ter določljiv na majhni površini lise. Kot primerna pokazatelja hematokrita sta bila predlagana hemoglobin (Hb) in kalij. Pri Hb se je izkazalo, da ni stabilen skozi daljše časovno obdobje. Tako je kalij trenutno edini kazalnik, ki ustreza vsem pogojem. Kalij je elektrolit, ki se približno 35-krat bolj porazdeljuje v notranjosti celic kot v plazmi, razmerje pa je dobro fiziološko uravnavano. Iz lis ga je potrebno najprej ekstrahirati, nato pa se njegova koncentracija meri s pomočjo indirektna potenciometrije in ion-selektivne elektrode (28).

1.5. Hemoliza

Hemoliza nastane z razpadom krvnih celic, zaradi česar se hemoglobin in znotrajcelične komponente sprostijo v plazmo oz. serum. Hemolizo opredelimo kot rahlo, srednjo ali močno hemolizo in jo vidno zaznamo, ko je koncentracija Hb v plazmi višja od 0,25 g/L.

Vzrokov za nastanek hemolize je več, navadno jih delimo na *in vivo* ter *in vitro* vzroke. *In vivo* hemolizo povzročijo nekatera zdravila, dedni dejavniki, encimske nepravilnosti, povišano število levkocitov in druge toksične snovi (29). *In vitro* hemoliza pa nastane med odvzemom venske krvi, transportom in pripravo krvnih vzorcev. Dejavniki, ki lahko povzročijo hemolizo so debelina igle za odvzem, izbira vene, rokovanje z vzorcem, lega epruvete med prenašanjem, previsoka ali prenizka temperatura ter centrifugiranje in ločevanje krvnih komponent (30).

1.5.1. Hemoliza pri določevanju porazdeljevanja učinkovine v celice in plazmo

Pri primerjavi koncentracij učinkovin v DBS in v plazmi je potrebno hemolizo skrbno spremljati, kar še posebej velja za učinkovine, ki se porazdeljuje v krvne celice in imajo visok porazdelitveni koeficient K. Pri teh učinkovih že najmanjša hemoliza povzroči občutno povečanje plazemskih koncentracij učinkovine (22). Primer je PEU topiramata, ki ima porazdelitveni koeficient K 12, tako da že 0,5% hemoliza povzroči povečanje plazemske koncentracije za 9%.

1.5.2. Kvantitativno vrednotenje hemolize

Za določanje porazdeljevanja učinkovin v krvne celice in plazmo subjektivna opredelitev z vidno oceno hemolize ne zadostuje. Najboljši način za določevanje hemolize v krvi je z uporabo validirane kvantitativne metode za merjenje hemoglobina v plazmi. Večina metod temelji na absorpcijskih sposobnostih hemoglobina. Absorbanco lahko merimo z direktno tehniko, pri kateri je kvantifikacija osnovana na oksihemoglobinu z absorpcijskimi vrhovi pri 415, 541 ali 576 nm. Pri drugi, indirektni tehniki pa s kemijsko reakcijo pretvorimo hemoglobin v obarvan produkt, ki absorbira pri določeni valovni dolžini. Standardna metoda za merjenje hemoglobina je pretvorba vseh vrst hemoglobina v cianometemoglobin s pomočjo kalijevega cianida in kalijevega železovega cianida. Iz poznane vrednosti hemoglobina v plazmi ($C_{Hb\ pl.}$), celokupnega hemoglobina ($C_{Hb\ cel.}$) v krvi ter hematokrita (HT), lahko izračunamo hemolizo po enačbi 3 (29):

$$\% \text{ hemolize} = \frac{C_{Hb\ pl.} \cdot (100 - HT)}{C_{Hb\ cel.}}$$

Enačba 3

2 NAMEN DELA

Metoda DBS je relativno enostavna metoda vzorčenja majhnega volumna kapilarne ali venske krvi, ki predstavlja dobro alternativo konvencionalnemu vzorčenju iz komolčnega pregiba. Primerna je za TDM, a so referenčne in terapevtske vrednosti, ki se za TDM uporabljajo, večinoma določene za plazemske vzorce. Za uporabo metode DBS v klinični praksi, je zato potrebno poiskati povezavo med izmerjenimi koncentracijami učinkovin v plazmi in v DBS.

Namen magistrske naloge je izdelava protokola za določanje porazdelitvenih koeficientov med krvnimi celicami in plazmo. Ti bi nam omogočili neposredno pretvorbo koncentracij analitov v polni krvi, v koncentracije analitov v plazmi, za katera so podana referenčna območja.

Osredotočili se bomo na kritične korake pri pripravi obogatene krvi z različnimi hematokriti. Primerjali bomo dva postopka priprave krvnih vzorcev z različnimi HT ter ovrednotili vpliv časa, topila in učinkovine na točnost meritev HT in na hemolizo. Pri tem bomo merili vrednosti hematokrita na aparatu Horiba, Microsemi CRP ter spektrofotometrično določali sproščen hemoglobin iz poškodovanih eritrocitov v plazmi.

Za izbrana PEU in metabolite bomo določili čas inkubacije krvnih vzorcev, do porazdelitve učinkovin med krvne celice in plazmo. Obogatene krvne vzorce z različnimi hematokriti bomo v različnih časovnih intervalih inkubirali in z meritvami v plazmi določili čas do vzpostavitve ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo.

Na koncu bomo z optimalno metodo pripravili krvne vzorce z dvema različnima HT, jih obogatili s PEU in metaboliti v dveh koncentracijah, inkubirali do vzpostavitve ravnotežja, ter določili koncentracijo v polni krvi – v posušeni krvni madeži in v plazmi. Koncentracije v DBS in v plazmi bomo merili z validiranimi analiznimi metodami na napravi HPLC. Iz njihovih vrednosti bomo izračunali porazdelitvena koeficienta K in R ter rezultate ustrezno interpretirali.

3 MATERIALI

3.1. Biološki vzorci

Pri pripravi krvnih vzorcev smo uporabili svežo kri odvzeto v vakuumsko epruveto z dodano etilendiamintetraocetno kislino (EDTA), ki je preprečevala strjevanje krvi.

3.2. Standardi

Kemikalija	Formula	MW [g/mol]	Proizvajalec
Epokarbamazepin	$C_{15}H_{12}N_2O_2$	252,3	Sequoia Research Products, Pangbourne, Velika Britanija
Karbamazepin	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Natrijeva sol valprojske kisline	$C_8H_{15}NaO_2$	166,2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Likarbazepin	$C_8H_{14}O_2$	142,2	Sequoia Research Products, Pangbourne, Velika Britanija
Kloramfenikol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	144,2	Sequoia Research Products, Pangbourne, Velika Britanija
Zonisamid	$C_8H_8N_2O_3S$	212,2	Sequoia Research Products, Pangbourne, Velika Britanija
Fenitoin	$C_{15}H_{12}N_2O_2$	252,3	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Lamotrigin	$C_9H_7Cl_2N_5$	256,1	Sequoia Research Products, Pangbourne, Velika Britanija
Fenobarbiton	$C_{12}H_{12}N_2O_3$	232,2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Hemin	$C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$	652,0	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

3.3. Reagenti in topila

- 98 - 100 % mravljinčna kislina HCOOH, M = 46,03 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- Acetonitril C_2H_3N Chromasol V® gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9\%$; M = 41,05 g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Bidestilirana voda – milli-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost >

18,2 mΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) < 6 ppb (pri T = 25 °C), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana

- Kalijev dihidrogenfosfat KH₂PO₄, for analysis, M = 136,08 g/mol, (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Metanol CH₃OH CHROMASOLV®, for HPLC, ≥ 99,9 %; M = 32,04 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Stisnjen dušik N₂, za preprihanje (Messer, Ruše, Slovenija)
- 1 M raztopina natrijevega hidroksida NaOH
- 1 M raztopina klorovodikove kisline HCl
- Standardne pufrske raztopine pH = 3,00 do 7,00; (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) in (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)

3.4. Naprave in pribor

- Hladilnik 3 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik SANYO (T = -80 °C) (SANYO electric Co., Ltd., Osaka, Japonska)
- Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Termostat kolone Varian Pro star 510 (VARIAN medical systems, Palo Alto, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- Tehnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Centrifugi Eppendorf 5804 in 5415 R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Centrifuga Centric 322A (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Stresalnik VORTEMP 56EVC (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)
- Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Koper, Slovenija)
- Mešalnik Vibromix 10 (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Mikrotitrski čitalec plošč Tecan Safire, (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica)
- Microsemi CRP (Horiba, Kyoto, Japonska)
- Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX (Bandelin electronic, Berlin, Nemčija)

- Polavtomatske pipete 2 - 20 μ l, 20 - 200 μ l, 200 - 1000 μ l (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Plastične epruvete 1,5 in 2 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija) in 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- Celulozno acetatni filter 0,45 μ m (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija)
- HPLC kolona; Phenomenex, Luna Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Predkolona za HPLC; Phenomenex 4 x 3 mm C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, viala, inserti za viala, presesalna buča in lij za presesalno bučo.

Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, magneti, magnetna palica za odstranjevanje magnetov, pokrovčki za viala, plastične kapalke, epruvete namenjene za vakuumski odvzem venske krvi (EDTA), lateks rokavice in Parafilm®M.

4 METODE

4.1. Analizni metodi

4.1.1. Analizna metoda za določanje koncentracij PEU v plazmi

Plazemske vzorce smo analizirali na HPLC po prirejeni metodi, ki je bila razvita v okviru doktorske disertacije Daniele Milosheske (31).

- Umeritvena krivulja

Najprej smo pripravili osnovne raztopine (OR) učinkovin/metabolitov: karbamazepin (CBZ), epokarbamazepin (EpoCBZ), likarbazepin (LiCBZ), fenitoin (PHT), lamotrigin (LTG) in zonisamid (ZON). To smo storili tako, da smo ustrezno količino substance natehtali in raztopili v metanolu (MeOH), da smo dobili OR s koncentracijo 5,00 mg/ml. OR smo združili v delovno raztopino (DR) 8 ter iz nje pripravili ostale DR. Plazemske kalibratorje smo pripravili tako, da smo združili 320 µl slepe plazme in 20 µl delovne raztopine. Priprava DR in plazemskih kalibratorjev je prikazana v spodnji preglednici IV.

Preglednica IV: Priprava delovnih raztopin in kalibratorjev za umeritveno krivuljo.

	Priprava delovnih raztopin		Volumen MeOH:H ₂ O = 1:1 (v/v). (µl)	Koncentracije analitov v plazemskih kalibratorjih (20 µl DR + 320 µl plazme) (µg/ml)	
DR 8	200 µl OR	ZON in LiCBZ	427	ZON, LiCBZ	50,00
	100 µl OR	CBZ, PHT in LTG		CBZ, PHT, LTG	25,00
	50 µl OR	EpoCBZ		EpoCBZ	12,50
DR 7	160 µl DR 8		40	ZON, LiCBZ	40,00
				CBZ, PHT, LTG	30,00
				EpoCBZ	10,00
DR 6	120 µl DR 8		80	ZON, LiCBZ	30,00
				CBZ, PHT, LTG	20,00
				EpoCBZ	10,00
DR 5	80 µl DR 8		120	ZON, LiCBZ	20,00
				CBZ, PHT, LTG	10,00

			EpoCBZ	5,00
DR 4	40 µl DR 8	160	ZON, LiCBZ CBZ, PHT, LTG EpoCBZ	10,00 5,00 2,50
DR 3	60 µl DR 8	540	ZON, LiCBZ CBZ, PHT, LTG EpoCBZ	5,00 2,50 1,25
DR 2	100 µl DR 3	100	ZON, LiCBZ CBZ, PHT, LTG EpoCBZ	2,50 1,25 0,63
DR 1	50 µl DR 3	200	ZON, LiCBZ CBZ, PHT, LTG EpoCBZ	1,00 0,50 0,25
DR 0	0 µl	20	Koncentracija analitov	0,00

- Priprava plazemskih vzorcev, kalibratorjev umeritvene krivulje in internega standarda

Iz zamrzovalnika smo vzeli plazemske vzorce za določitev koncentracij analitov. Vzorce smo odtalili in jih nekaj sekund mešali na vibracijskem mešalu. Kalibratorje umeritvene krivulje smo pripravili tako, da smo od plazemskih kalibratorjev odvzeli 50 µl, ter jih prenesli v nove 1,5 ml plastične epruvete. Za pripravo internega standarda smo natehtali ustrežno količino fenobarbitona, ga raztopili v MeOH in tako dobili raztopini fenobarbitona s koncentracijo 5,00 mg/ml. Raztopino smo nadalje redčili z mešanico metanola in vode (1:1), do koncentracije 40,00 µg/ml.

Odtaljenim plazemskim vzorcem in kalibratorjem umeritvene krivulje smo dodali 20 µl IS. K slepi raztopini smo dodali 20 µl raztopine MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v). Vzorce smo 30 sekund mešali na vibracijskem mešalu, nato pa smo jim dodali 400 µl acetonitrila (AcN), ohlajenega na -20 °C. Sledilo je ponovno 30 s mešanje na vibracijskem mešalu, za tem pa še 10 min centrifugiranje pri 5000 g in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo 400 µl supernatanta prenesli v nove 1,5 ml plastične epruvete, ki smo jih postavili v napravo Turbovap. V tej napravi smo vzorce posušili s pomočjo prepihanja z dušikom pri 40 °C. Posušene vzorce smo rekonstituirali v 100 µl raztopini MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v)

in jih 60 s stresali na vibracijskem mešalu. Nato smo vzorce za 1 min postavili v centrifugo pri 16100 g ter 80 µl supernatanta prenesli v vialo z inserti.

- Kromatografska analiza

Koncentracije analitov smo določali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). Uporabili smo kolono Luna Phenyl-Hexyl s predkolono Gemini C6-Phenyl segreto na 40 °C. Mobilna faza (MF) je bila sestavljena iz fosfatnega pufera (25 mM; pH 5,1) in metanola.

Fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo v 2 l bučko natehtali 6,804 g KH_2PO_4 , bučko do oznake napolnili z MiliQ vodo in vsebino dobro premešali, da se je ves KH_2PO_4 raztopil. Raztopini smo izmerili pH in ga uravnali na vrednost 5,1. Tako pripravljen pufer smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter papir in ga pred analizo še za 15 minut postavili v ultrazvočno (UZ) kadičko.

Uporabili smo gradientno metodo z analiznim časom 27 minut, vključno s 4 minutami ekvalibracije. Analite smo detektirali pri 219 nm. Program gradientne elucije je prikazan v preglednici V.

Preglednica V: Program gradientne elucije za kromatografsko ločbo 6 PEU.

Čas (min)	% metanola	pretok
0	25	1 ml/min
5	30	1 ml/min
10	40	1 ml/min
15	42	1 ml/min
19	70	1 ml/min

4.1.2. Analizna metoda za določanje koncentracij PEU v DBS

Vzorce DBS smo analizirali po metodi, ki je bila razvita v magistrski nalogi Martina Miklja (32).

Metodo smo najprej preizkusili na učinkovinah LiCBZ, EpoCBZ in CBZ ter z IS kloramfenikolom (KF). Zaradi delnega prekrivanja IS in LiCBZ smo kloramfenikol zamenjali s PHT. Nato smo enako metodo prenesli še na učinkovini ZON in PHT in za IS uporabili KF.

Pri analizi LTG, smo se odločili, da malenkost spremenimo sestavo mobilne faze, saj smo s tem zamaknili odziv analita. Preizkušali smo tudi dve različni sestavi ekstrakcijska topila in izbrali na podlagi boljšega razmerja med odzivom analita in matriksom.

- Umeritvena krivulja

Umeritveno krivuljo za vzorce DBS, zaradi potencialnega prekrivanja, nismo mogli pripraviti za vse spojine skupaj, kot smo to lahko storili pri analizi plazemskih vzorcev. Vseeno smo nekatere spojine združili v isto DR in tako dobili tri različne umeritvene krivulje. CBZ, LiCBZ in EpoCBZ smo združili v DR za prvo umeritveno krivuljo ter ZON in PHT za drugo. LTG smo ločeno pripravili na tretji umeritveno krivulji.

Osnovne raztopine vseh preiskovanih spojin s koncentracijo 5,00 mg/mL smo že imeli pripravljene in shranjene v zamrzovalniku. Iz osnovnih raztopin smo pripravili koncentracije DR (C_{DR}), kot prikazuje preglednica VI.

Preglednica VI: Priprava delovnih raztopin za umeritveno krivuljo DBS

Analit	Volumen osnovne raztopine (5,00 mg/mL) (μ l)	Volumen MeOH: H ₂ O = 1:1 (v/v) (μ l)	C_{DR} (mg/ml)
CBZ	100,0	100,00	2,50
EpoCBZ	50,00	150,00	1,25
LiCBZ	200,00	0,00	5,00
PHT	100,00	100,00	2,50
LTG	100,00	100,00	2,50
ZON	200,00	0,00	5,00

Delovne raztopine smo nadalje redčili, pri tem smo upoštevali zelene koncentracije v obogatenih krvnih kalibratorjih, kot prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII: Priprava raztopin za krvne kalibratorje

	Volumen analitov			Volumen MeOH:H ₂ O = 1:1 (μ l)	Koncentracije analitov v krvnih vzorcih (20 μ l DR + 280 μ l krvi) (μ g/ml)		
	1.*	2.*	3.*		1.*	2.*	3.*

DR 8	75 µl DR	LiCBZ	ZON	LTG	275	LiCBZ	ZON	LTG	50,00
	75 µl DR	CBZ	PHT			CBZ	PHT		25,00
	75 µl DR	EpoCBZ				EpoCBZ			12,50
DR 7	80 µl DR 8				20	LiCBZ	ZON	LTG	40,00
						CBZ	PHT		20,00
						EpoCBZ			10,00
DR 6	60 µl DR 8				40	LiCBZ	ZON	LTG	30,00
						CBZ	PHT		15,00
						EpoCBZ			7,50
DR5	40 µl DR 8				60	LiCBZ	ZON	LTG	20,00
						CBZ	PHT		10,00
						EpoCBZ			5,00
DR 4	20 µl DR 8				80	LiCBZ	ZON	LTG	10,00
						CBZ	PHT		5,00
						EpoCBZ			2,50
DR 3	30 µl DR 8				270	LiCBZ	ZON	LTG	5,00
						CBZ	PHT		2,50
						EpoCBZ			1,25
DR 2	50 µl DR 3				50	LiCBZ	ZON	LTG	2,50
						CBZ	PHT		1,25
						EpoCBZ			0,63
DR 1	25 µl DR 3				100	LiCBZ	ZON	LTG	1,00
						CBZ	PHT		0,50
						EpoCBZ			0,25
DR 0	0 µl DR 3				20	Koncentracija analitov			0,00

* številke 1, 2 in 3 po vrsti označujejo prvo, drugo in tretjo umeritveno krivuljo.

Obogatene krvne kalibratorje smo pripravili tako, da smo k 280 µl krvi dodali 20 µl pripravljenih DR ter 20 s mešali na vibracijskem mešalu. Nato smo s pipetorjem nanesti po 20 µl krvnih vzorcev na papir DBS in za vsako koncentracijo naredili približno 10 krvnih lis. DBS vzorce smo čez noč sušili pri sobni T, naslednji dan pa smo jih shranili v plastične vrečke z dodanim sušilnim sredstvom.

- Priprava vzorcev DBS, kalibratorjev in internega standarda za kromatografsko analizo

Vzorci DBS in kalibratorje smo s škarjami izrezali iz papirčkov DBS in jih vstavili v 2 ml plastične epruvete. Ker so bile 20 µl krvne lise prevelike za ozke plastične epruvete, smo jih razrezali na četrtine. Za pripravo internih standardov kloramfenikola in fenitoina smo natehtali ustrezno količino spojine, jo raztopili v MeOH in tako dobili osnovni raztopini KF in PHT s koncentracijo 5,00 mg/ml. OR smo nadalje redčili z raztopino MeOH in vode (1:1), do koncentracije 40,00 µg/ml. Pri kromatografski analizi ZON, PHT in LTG smo za interni standard uporabili KF. Za analizo CBZ, LiCBZ in epoCBZ pa smo za interni standard uporabili PHT.

Kot ekstrakcijsko topilo smo pri vseh učinkovinah z izjemo LTG, uporabili 680 µl 0,5 % mravljinčne kisline (FA) v raztopini ACN in H₂O v razmerju 4:1 (v/v). LTG smo iz papirčkov ekstrahirali z 680 µl raztopine MeOH in H₂O v razmerju 80:20 (v/v). Vzorcem smo dodali še 20 µl IS in jih 30 s mešali z vibracijskim mešalom ter še za 15 minut postavili v UZ kadičko. Za tem smo vzorce pet minut centrifugirali pri 5488 g in 4 °C. Sledilo je prenašanje 620 µl supernatanta v 1,5 ml plastično epruveto in sušenje na napravi Turbovap, predhodno segreti na 40 °C. Ko so bili vzorci popolnoma suhi, smo jih rekonstituirali v 100 µl raztopine MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v) in 40 s mešali z vibracijskim mešalom. Ker so bili v raztopini še prisotni drobni trdni delci, smo jih za 5 minut postavili v centrifugo pri najvišjih obratih, 16100 g in 4 °C. Nato smo 80 µl raztopine prenesli v vialo z inserti.

- Kromatografska analiza

Kromatografska metoda je bila ponovno enaka za vse spojine, razen za LTG. Uporabili smo kolono Luna 5u, Phenyl-Hexyl, segreto na 55 °C. MF je bila sestavljena iz KH_2PO_4 s koncentracijo 25 mM in pH 5,1 ter metanola. Metoda je bila izokratska v razmerju obeh komponent 50:50 (v/v) in pretokom 1,0 ml/min. Injicirali smo 50 µl vzorca. Čas analize je bil 12 min, detekcija pa je potekala pri 215 nm.

Kromatografska metoda za LTG, se je od ostalih razlikovala zgolj v sestavi mobilne faze, razmerje med fosfatnim pufrom in metanolom je bilo namreč 60:40 (v/v).

4.2. Metoda za določanje hemoglobina v plazmi

Postopek določitve hemoglobina v plazmi smo prilagodili po metodi, ki so jo razvili *Franchik in sodelavci* (33). Osnova postopka je spektrofotometrična meritev hemoglobina, ki s pretvorbo v obarvan produkt absorbira pri 575 nm.

Franchik in sodelavci so metodo razvili na mikrotitrskih ploščicah z linearnostjo od 3,25 - 250 mg/dl. Za določitev hemoglobina v plazmi je bilo potrebno v vdolbine mikrotitrške ploščice dodati 100 μ l vzorca in 150 μ l reagenta ter 30 minut inkubirati na stresalniku pri 650 rpm. Meritve so se izvedle s pomočjo spektrofotometra pri valovni dolžini 575 nm.

Metodo smo zaradi slabe točnosti umeritvene krivulje, modificirali tako, da smo analizirali po 50 μ l vzorcev, ki smo jim dodali 200 μ l reagenta. Sledila je pet minutna inkubacija pri sobni temperaturi ter meritev na spektrofotometru pri 575 nm. S tem smo zmanjšali volumen plazemskega vzorca in skrajšali čas inkubacije.

• 4.2.1. Umeritvena krivulja za hemin

Kot standard za umeritveno krivuljo smo uporabili hemin, ki smo ga natehtali in raztopili v 0,1 M NaOH ter tako dobili osnovno raztopino hemina s koncentracijo 1000 mg/dl. Osnovno raztopino smo nadalje redčili z vodo in pripravili standarde (ST) hemina za dve umeritveni krivulji (preglednici VIII in IX).

Preglednici VIII in IX: Priprava standardov hemina za umeritveni krivulji v koncentraciji od 20-200 mg/dl (levo) in od 2-20 mg/dl (desno).

	Volumen razt.	V _{H2O} (μ l)	C _{hemin} (mg/dl)
ST 20	300 μ l OR	1200	200
ST 19	270 μ l ST 20	30	180
ST 18	240 μ l ST 20	60	160
ST 17	210 μ l ST 20	90	140
ST 16	180 μ l ST 20	120	120
ST 15	150 μ l ST 20	1350	100
ST 14	240 μ l ST 20	60	80
ST 13	180 μ l ST 14	120	60
ST 12	120 μ l ST 14	180	40
ST 11	60 μ l ST 14	240	20

	Volumen razt.	V _{H2O} (μ l)	C _{hemin} (mg/dl)
ST 10	40 μ l OR	1960	20
ST 9	270 μ l ST 10	30	18
ST 8	240 μ l ST 10	60	16
ST 7	210 μ l ST 10	90	14
ST 6	180 μ l ST 10	120	12
ST 5	150 μ l ST 10	150	10
ST 4	120 μ l ST 10	180	8
ST 3	90 μ l ST 10	210	6
ST 2	60 μ l ST 10	240	4
ST 1	30 μ l ST 10	270	2

- Priprava alkalnega reagenta za pretvorbo hemoglobina v hematin, angl. »Alkaline hematin detergent« (AHD)

Reagent AHD vsebuje 2,5 % Tritona X-100 v 0,1 mol/l natrijevem hidroksidu (NaOH). Pripravili smo ga tako, da smo s pipetorjem odpipetirali 0,75 ml 90 % Tritona in mu dodali 29,25 ml 0,1 mol/l NaOH.

- Spektroskopska meritev hemoglobina v plazemskih vzorcih

Iz zamrzovalnika smo vzeli plazemske vzorce za ovrednotenje koncentracije hemoglobina v plazmi. Vzorce smo odtalili na sobni temperaturi in jih nekaj sekund mešali na magnetnem mešalu.

Pripravili smo si mikrotitrsko ploščico z ravnim dnom. Na ploščico smo najprej nanesti 50 μ l slepe raztopine prečiščene vode, nato smo po vrsti nanesti po 50 μ l standardov umeritvenih krivulj. Za boljšo natančnost umeritvene krivulje smo standarde nanesti v treh paralelkah in pri izračunih uporabili povprečje. Za standardi smo v enakem volumnu v prazne vdolbine nanesti še plazemske vzorce. Pripravljen AHD reagent smo prelili v široko posodico in ga z multikanalno pipeto dodajali v vsako vdolbino mikrotitrsko ploščice v volumnu 200 μ l. Pri tem smo pazili, da smo vsakič pipetirali tik ob levem robu vdolbin in s tem preprečili penjenje reagenta. Nato smo mikrotitrsko ploščico pokrili s pokrovom in jo pet minut inkubirali pri sobni temperaturi, da je reakcija pretvorbe hemoglobina v obarvan produkt potekla. Po petih minutah smo ploščico odkrili, jo postavili v spektrofotomer in izmerili absorbanco pri 575 nm.

4.3. Meritve hematokrita

Vse meritve hematokrita smo izvajali na hematološkem analizatorju Horiba, Microsemi CRP. Pred vsako meritvijo smo vzorce v 1,5 ml plastičnih epruветah homogenizirali tako, da smo epruветo v navpičnem položaju obrnili za 180 ° in postopek ponovili 10 krat. Vsebino 1,5 ml epruветe smo prenesli v večjo 4 ml plastično epruветo, ki je ustrezala nastavku aparata. Aparat je za meritve krvnih kazalnikov potreboval zgolj 10 μ l krvi, a je moral biti minimalni volumen vzorca v epruветi, zaradi občutljivosti igle, 300 μ l. Meritev krvnih vrednosti in njihov izpis sta bila opravljena v eni minuti. Po končani meritvi smo preostanek krvnega vzorca prenesli nazaj v 1,5 ml plastično epruветo ter kasneje vzorec še 5 minut

centrifugirali pri 2000 g in plazmo zamrznili za nadaljnje poskuse. Enak postopek smo ponovili za vse vzorce.

4.4. Priprava krvi z različnimi hematokriti

Za pripravo krvi z različnimi hematokriti smo uporabili metodo, ki so jo razvili *Koster in sodelavci* (26). Primerjali smo dva postopka. Po obeh postopkih smo pripravili krvne vzorce z vrednostmi hematokrita 0,2; 0,4 in 0,6, s čimer smo zajeli širše območje vrednosti HT. Po končani pripravi, smo hematokrit pomerili na hematološkem aparatu, izračunali točnost priprave krvnih vzorcev ter na podlagi statističnih rezultatov ter praktičnosti metode izbrali primernejši postopek.

4.4.1. Prvi postopek – dodajanje in odvzemanje plazme

Po prvem postopku, smo vzorcu sveže odvzete krvi najprej izmerili hematokrit na hematološkem aparatu. Nato smo kri s pipeto, po v naprej pripravljene shemi, razdelili v štiri plastične epruvete z volumnom 2 ml. Sledilo je pet minutno centrifugiranje pri 2000 g, da sta se komponenti celic in plazma ločili. Po centrifugiranju smo vzorcem, glede na začetni izmerjeni hematokrit, dodali oz. odvzeli plazmo, tako da smo dobili želene vrednosti HT. Dodatna, četrta plastična epruveta, nam je služila zgolj kot presežek plazme za dodajanje. Krvne vzorce smo previdno homogenizirali, kot je opisano pri točki 4.3. Iz vsake plastične epruvete smo tako pripravljeno kri, razdelili v tri paralelke, ter točnost pripravljenega HT preverili s hematološkim aparatom.

Preglednica X: Primer priprave krvi po prvem postopku

Izmerjen začetni HT	0,45	0,45	0,45
Končni HT	0,20	0,40	0,60
V začetne krvi (ml)	0,500	1,000	1,800
V celic na koncu (ml)	0,225	0,450	0,810
V plazme na koncu (ml)	0,900	0,675	0,540
V dodane plazme (ml)	0,625	0,125	- 0,450
V krvi na koncu	1,125	1,125	1,350

4.4.2. Drugi postopek – pipetiranje krvnih celic in plazme

Po drugem postopku smo svežo odvzeto kri v vakuumski epruveti centrifugirali 30 min pri 4637 g, da sta se plasti krvnih celic in plazme ločili. Nato smo v tri 2 ml plastične epruvete odpipetirali izračunane volumne plazme. Ko smo prišli do plasti krvnih celic, smo najprej 300 μ L zgornjega sloja celic zavrgli, saj se v tem sloju še vedno nahaja znatna količina plazme. Preostali del celic smo nežno homogenizirali in odpipetirali pripadajoče volumne krvnih celic k plazmi. Krvne vzorce smo ponovno homogenizirali in razdelile v tri paralelke, enako kot pri prvem postopku. Prav tako smo ustreznost pripravljenega HT preverili na hematološkem aparatu.

Preglednica XI: Shema priprave krvnih vzorcev po drugem postopku

	Epruveta 1	Epruveta 2	Epruveta 3
Končni hematokrit	0,20	0,40	0,60
Končni volumen krvi (ml)	1,60	1,60	1,60
Končni volumen plazme (ml)	1,28	0,96	0,64
Končni volumen celic (ml)	0,32	0,64	0,96

4.5. Vpliv časa inkubacije na hemolizo

Z izbranim postopkom iz točke 4.4. smo pripravili krvne vzorce. Za celoten poskus smo potrebovali svežo kri v šestih vakuumskih epruvetah z volumnom 6 ml, ki smo jo razdelili v pet 2 ml plastičnih epruvet za vsak HT (0,2; 0,4; 0,6). Vpliv časa na hemolizo smo preverjali pri 5 časovnih točkah: 0, 15, 30, 60 in 120 minut.

Iz vsake plastične epruvete smo pripravljene krvne vzorce razdelili v 3 paralelke po 300 μ L, razen pri HT 0,6 kjer smo kri razdelili po 400 μ L. Tako smo dobili 45 vzorcev, kar je zadostovalo za 5 časovnih točk. Prvi seriji vzorcev smo takoj pomerili HT in tako dobili vrednosti ob času 0 minut. Ostale vzorce smo inkubirali v stresalniku na minimalnem stresanju, 20 rpm in pri temperaturi 37 °C, saj smo si želeli ohraniti pogoje, ki bi bili čimbolj podobni fiziološkimi. Vzorce smo po 15, 30, 60 in 120 minutah zaporedno jemali iz stresalnika, ter jim pomerili HT.

Po končanih vseh meritvah smo vzorce 5 minut centrifugirali pri 2000 g, plazmo smo prenesli v nove plastične epruvete ter jih zamrznili na -20 °C. Z meritvami iz eritrocitov sproščenega hemoglobina v plazmi bi dobili še dodatno informacijo o hemolizi.

4.6. Vpliv topila na hemolizo

Testirali smo vpliv dveh topil, metanola in acetonitrila, ki smo ju k pripravljenim krvnim vzorcem s tremi različnim HT dodajali v 1 %, 3 % in 5 % glede na končni volumen krvi.

Za poskus smo potrebovali sedem 6 ml epruвет sveže krvi. Po postopku iz točke 4.4 smo pripravili kri z različnimi vrednostmi hematokrita, 0,2; 0,4 in 0,6. Kri smo za vsak HT namešali v 6 2 ml plastičnih epruвет. Za tem smo iz vsake 2 ml plastične epruветe odpipetirali po 3 paralelke krvnih vzorcev v 1,5 ml plastične epruветe in jim dodali različne deleže metanola oz. acetonitrila. Pripravili smo tudi slepe vzorce, katerim smo v enakih deležih kot pri dodajanju topila, dodajali plazmo. Podrobno pipetiranje prikazuje preglednica XII. Zaradi optimalnejšega časovnega poteka smo na začetku hkrati aktivirali le prvo paralelko vzorcev vseh možnih kombinacij, 2. in 3. paralelko pa smo aktivirali po 30 oz. 60 minutah.

Preglednica XII: Priprava krvnih vzorcev z dodanim topilom

Shema za HT: 0,2 in 0,4	V vzorcev (μl)	V topila/plazme (μl)	V končni (μl)
1 % topila/plazme	297	3	300
3 % topila/plazme	291	9	300
5 % topila/plazme	285	15	300
Shema za HT: 0,6			
1 % topila/plazme	396	4	400
3 % topila/plazme	388	12	400
5 % topila/plazme	380	20	400

Po dodatku topila oz. plazme smo vsak vzorec nežno homogenizirali kot je opisano pri točki 4.3., ter eno uro inkubirali v stresalniku pri 37 °C in stresanju 20 rpm. Po končani inkubaciji smo vzorcem pomerili hematokrit na hematološkem aparatu. Nato smo jih centrifugirali 5 minut pri 2000 g ter od krvnih celic ločili 50 μl plazme, ki smo jo zamrznili na -20 °C za kasnejši poskus določitve hemoglobina v plazmi.

4.7. Vpliv učinkovine na hemolizo

Pri tem poskusu smo želeli preveriti vpliv učinkovine na hemolizo. Izbrali smo si protiepileptični učinkovini karbamazepin in valprojsko kislino (VPA), ki smo ju k pripravljenim krvnim vzorcem dodajali v maksimalni terapevtski koncentraciji.

4.7.1. Priprava osnovnih in delovnih raztopin

Najprej smo pripravili raztopini natrijevega valproata in karbamazepina. Natehtali smo ustrezne količine spojin, jih raztopili v MeOH ter tako dobili OR CBZ s koncentracijo 5,00 mg/ml in OR natrijevega valproata s koncentracijo 5,75 mg/ml, kar je ustrezalo 5,00 mg/ml valprojske kisline. Pri pripravi delovnih raztopin smo upoštevali maksimalni terapevtski koncentraciji ter razmerje končnega volumna krvnih vzorcev in volumna dodane delovne raztopine h krvnim vzorcem (preglednici XIII in XIV).

Preglednica XIII: Izračun koncentracij delovne raztopine učinkovin za dodajanje h krvnim vzorcem (C_{DR}).

Učinkovina	Maksimalna ter. koncentracija (mg/L)	V končnih vzorcev/V dodane raztopine	$C_{DR} \left(\frac{mg}{ml}\right)^*$
VPA	12	300/9 oz. 400/12	0,4
CBZ	100		3,33

* $C_{DR} = \frac{C_{max} \cdot V_k}{V_{top}}$; C_{MAX} =maksimalna ter. koncentracija, V_k =končni volumen vzorcev, V_{DR} =Volumen dodane raztopine

Preglednica XIV: Priprava delovnih raztopin VPA in CBZ

Učinkovina	Volumen osnovne raztopine (μ l)	Volumen MeOH: H ₂ O = 1:1 (v/v) (μ l)	C_{DR} (mg/ml)
VPA	333,00	167,00	0,40
CBZ	40,00	460,00	3,33

4.7.2. Priprava obogatenih krvnih vzorcev

Za poskus smo potrebovali tri 6 ml epruvete sveže krvi. S postopkom iz prve točke smo pripravili krvne vzorce s hematokriti 0,2; 0,4 in 0,6. Za vsako vrednost HT smo pripravili tri 2 ml plastične epruvete, iz katerih smo nato krvne vzorce razdelili v tri paralelke po 291 μ l pri vrednosti hematokrita 0,2 in 0,4 ter po 388 μ l pri vrednosti HT 0,6. Skupaj smo tako

dobili po 9 paralelk krvnih vzorcev enakega HT. Pri HT 0,2 in 0,4 smo v prve tri paralelke dodali 9 μ l plazme, v druge tri 9 μ l pripravljene delovne raztopine VPA in v zadnje tri 9 μ l delovne raztopine CBZ. Pri vrednosti HT 0,6 je bil postopek enak, le da smo zaradi večjega volumna pripravljenih krvnih vzorcev, dodajali tudi večji volumen plazme oz. raztopin in sicer 12 μ l. Tako pripravljene vzorce, smo nežno premešali kot je opisano pri točki 4.3. ter eno uro inkubirali pri 37 °C in minimalnem stresanju. Po končani inkubaciji smo vzorcem pomerili hematokrit, jih pet minut centrifugirali pri 2000 g in plazmo ločeno zamrznili na -20 °C.

4.8. Določitev optimalnega inkubacijskega časa za vzpostavitev ravnotežja

Optimalni inkubacijski čas za vzpostavitev koncentracijskega ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo smo določili za CBZ, EpoCBZ, LiCBZ, PHT, LTG in ZON. Krvne vzorce smo pripravili z dvema vrednostnima HT in jih obogatili z največjo terapevtsko koncentracijo posamezne učinkovine.

4.8.1. Priprava osnovnih in delovnih raztopin

Koncentracija OR učinkovin CBZ, EpoCBZ, LiCBZ, PHT, LTG in ZON je bila 5,00 mg/ml. Iz osnovnih raztopin smo pripravili delovne raztopine, ob upoštevanju maksimalne terapevtske koncentracije ter razmerja končnega volumna krvnih vzorcev in volumna dodane delovne raztopine h krvnim vzorcem.

Preglednica XV: Izračun koncentracij učinkovin za dodajanje h krvnim vzorcem.

Učinkovina	Max. terapevtska konc. (mg/l)	V končnih vzorcev / V dodane raztopine	C _{DR} (mg/ml)
CBZ	12,00	300/9 oz. 400/12	0,40
EpoCBZ	8,00		0,27
LiCBZ	35,00		1,17
PHT	20,00		0,67
LTG	15,00		0,50
ZON	40,00		1,33

Preglednica XVI: priprava delovnih raztopin CBZ, EpoCBZ in LiCBZ, PHT, LTG in ZON.

Učinkovina	Volumen osnovne raztopine (5 mg/ml)	Volumen MeOH: H ₂ O = 1:1 (v/v) (μl)	C _{DR} (mg/ml)
CBZ	34,30		0,40
EpoCBZ	22,90	270,20	0,27
LiCBZ	100,00		1,17
PHT	67,00	433,00	0,67
LTG	50,00	450,00	0,50
ZON	133,00	367,00	1,33

4.8.2. Priprava obogatenih krvnih vzorcev

Zaradi boljšega časovnega poteka smo poskus razdelili na dva dela. V prvem smo pripravili krvne vzorce in jih obogatili z ZON in PHT, v drugem pa z LTG in z, v enem vzorcu, združenimi analiti CBZ, EpoCBZ in LiCBZ.

Za prvi del priprave krvnih vzorcev smo potrebovali 30 ml sveže krvi. S postopkom iz točke 4.4. smo pripravili krvne vzorce s hematokriti 0,2 in 0,6 in sicer deset vzorcev v 2 ml plastičnih epruveh za vsako vrednost hematokrita. Krvne vzorce s hematokritom 0,2 smo iz 2 ml plastičnih epruveh razdelili v 1,5 ml plastične epruvete po 291 μl in 388 μl za vzorce s HT 0,6. Skupno smo dobili 60 vzorcev, ki smo jih razdelili na 5 delov oz. časovnih točk. Najprej smo učinkovini PHT in ZON v 3 % končnega volumna dodali k prvim 12 krvnim vzorcem. Vzorce smo nežno premešali z 10 x obračanjem za 180 °, centrifugirali 5 minut pri 2000 g ter ločili 50 μl plazme v nove 1,5 ml plastične epruvete. Za tem, smo v enakem deležu obogatili naslednjih 12 vzorcev ter jih za 15 minut postavili v stresalnik pri 37 °C in minimalnem stresanju. Po končani inkubaciji smo vzorce po enakem principu centrifugirali in ločili plazmo. Nato smo učinkovini dodali še v preostale tri serije vzorce, jih homogenizirali in inkubirali 30, 60 oz. 90 minut pri enakih pogojih kot drugo serijo. V 30 minutnih časovnih intervalih smo vzorce jemali iz stresalniku ter jih nadalje obravnavali enako kot prvo in drugo serijo vzorcev.

Plazemske vzorce smo do analize shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

Drugi del priprave krvnih vzorcev je bil identičen prvemu, le da smo namesto učinkovin PHT in ZON, h krvnim vzorcem dodajali LTG in raztopino združenih spojin CBZ, EpoCBZ in LiCBZ.

4.9. Določitev porazdelitvenih koeficientov K in R

Da bi preverili ustreznost postopka priprave obogatenih krvnih vzorcev z različnimi HT smo pri tem poskusu določili porazdelitvena koeficienta K in R za učinkovine CBZ, EpoCBZ, LiCBZ, PHT, LTG in ZON.

Krvne vzorce smo pripravili v dveh HT in jih obogatili z minimalno in maksimalno terapevtsko koncentracijo izbranih PEU in metabolitov. Vzorce smo eno uro inkubirali, nato pa smo iz vsakega vzorca pripravili DBS, po centrifugiranju pa še plazemske vzorce.

4.9.1. Priprava obogatenih krvnih vzorcev

Najprej smo si pripravili raztopine PEU in metabolitev za kasnejše dodajanje h krvnim vzorcem. Že pripravljene osnovne raztopine učinkovin CBZ, EpoCBZ, LiCBZ, PHT, LTG in ZON s koncentracijo 5,00 mg/mL smo redčili z raztopino MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v), kot prikazujeta preglednici XVII in XVIII.

Preglednica XVII: Izračun koncentracij delovnih raztopin za dodajanje h krvnim vzorcem.

	Maksimalna ter. koncentracija (mg/l)	minimalna ter. koncentracija (mg/l)	V končnih vzorcev / V dodane raztopine $\left(\frac{V_k}{V_{dod}}\right)$	C _{DR} max (mg/ml)	C _{DR} min (mg/ml)
CBZ	12,00	4,00	300/9 oz. 400/12	0,40	0,13
EpoCBZ	8,00	0,80		0,27	0,03
LiCBZ	35,00	3,00		1,17	0,10
PHT	20,00	10,00		0,67	0,33
LTG	15,00	2,50		0,50	0,08
ZON	40,00	10,00		1,33	0,33

Preglednica XVIII: Priprava delovnih raztopin za dodajanje h krvnim vzorcem.

Analit	Volumen osnovne raztopine (5 mg/ml)			Volumen MeOH:H ₂ O = 1:1 (v/v) (μl)		
	za C _{DR} max	za C _{DR} min		za C _{DR} max	za C _{DR} min	
CBZ	40	50	104	433	450	272
EpoCBZ	27	50	24		450	
LiCBZ	117	20		383	980	
PHT	67	33		433	467	
LTG	50	20		450	1230	
ZON	133	33		367	467	

Za poskus smo potrebovali 6 epruвет sveže krvi, kar je ustrezalo približno 30 ml krvi. Pripravili smo si 10 2 ml plastičnih epruвет s HT 0,2 in prav toliko tudi za hematokrit 0,6. Krvne vzorce s HT 0,2 smo razdelili v 1,5 ml plastične epruвете v volumnu 291 μl, vzorce s HT 0,6 pa smo odpipetirali z 388 μL. Na koncu smo dobili 60 vzorcev, 12 za vsako učinkovino oz. metabolit. Zaradi lažjega časovnega poteka, smo posamezne spojine v dveh koncentracijah dodajali s 30 minutnim časovnim zamikom. Pri tem smo združili karbamazepin in epokarbamazepin, saj sta ti dve spojini skupaj prisotni tudi v telesu. Po dodatku spojine smo plastične epruвете homogenizirali in eno uro inkubirali pri 37 °C ter minimalnem stresanju 20 rpm. Sledila je ponovno homogenizacija vzorcev, saj so se ti med inkubacijo že razplastili. Nato smo iz vsake plastične epruвете vzeli trikrat po 20 μl krvnega vzorca in ga nanесли na papirček DBS. Krvne lise smo preko noči sušili na sobni temperaturi, naslednji dan pa smo jih shranili v plastično vrečko z dodanim sušilnim sredstvom. Takoj po nanosu krvi na papirček DBS smo preostale vzorce prenesli v centrifugo in jih 5 minut centrifugirali pri 2000 g. Po ločitvi plazme od krvnih celic, smo odvzeli 50 μl plazme, jo prenesli v nove plastične epruвете in vzorce do analize zamrznili na -80 °C.

4.9.2. Analiza plazemskih in DBS vzorcev

Plazemske vzorce smo analizirali po analizni metodi, ki je opisana v točki 4.1.1. Vzorce DBS pa smo analizirali po postopku iz točke 4.1.2.

4.10. Statistična analiza podatkov

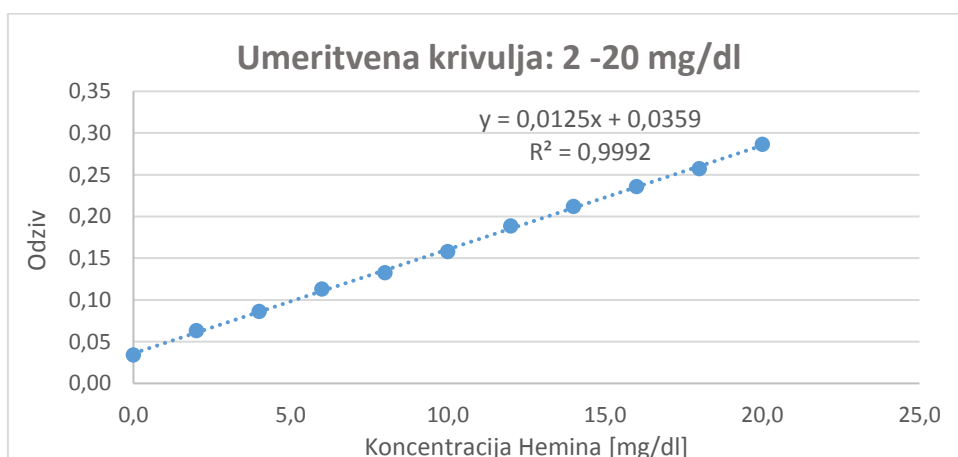
Podatke smo analizirali v programu IBM Statistical Package for Social Sciences za Windows (verzija 22.0; SPSS Inc. Chicago, IL, ZDA).

Ustrezen statistični test smo izbrali po predhodni analizi normalne porazdelitve vzorcev s testom Shapiro - Wilk. V kolikor vzorci niso bili normalno porazdeljeni, smo jih poskusili pretvoriti s pomočjo desetiškega logaritmiranja. Če vzorci tudi po pretvorbi niso bili normalno porazdeljeni, smo uporabili statistične teste za neparametrične vzorce. Pri analizi dveh skupin neparametričnih vzorcev smo uporabili Mann – Whitney U test, pri analizi treh ali več skupin pa test Kruskal-Wallis in post hoc test Mann – Whitney U z upoštevanimi korekcijami. V kolikor so bili vzorci pri analizi več kot treh skupin parametrični, smo uporabili enofaktorsko Anovo in post hoc test Bonferroni. Kot statistično značilne smo upoštevali p vrednosti, ki so bile manjše od 0,05.

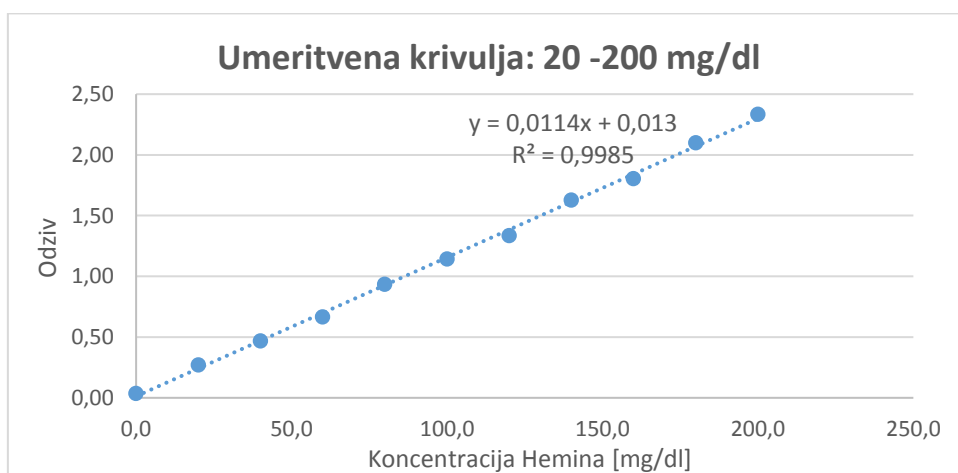
5 REZULTATI

5.1. Meritve hemoglobina v plazmi

Hemolizo smo določevali s posredno metodo, tako da smo spektrofotometrično merili hemoglobin v plazmi. Po optimizirani obstoječi metodi za določanje hemoglobina v plazmi, smo pripravili dve umeritveni krivulji z dobro točnostjo in ponovljivostjo. Za dve umeritveni krivulji smo se odločili zato, ker smo pri pripravi ene, dobili slabo točnost na spodnji meji umeritvene krivulje in je po smernicah ne bi smeli upoštevati. V tem primeru, bi bila metoda linearna v intervalu od 20-200 mg/dl, s čimer pa ne bi pokrili celotnega območja meritev naših vzorcev. Iz slik 1 in 2 lahko razberemo, da je metoda linearna v izbranih koncentracijskih območjih od 2-20 mg/dl (točnost kalibratorjev med 1,2 % in 9,0 %) in 20-200 mg/dl (točnost kalibratorjev med 0,4 % in 12,0 %).



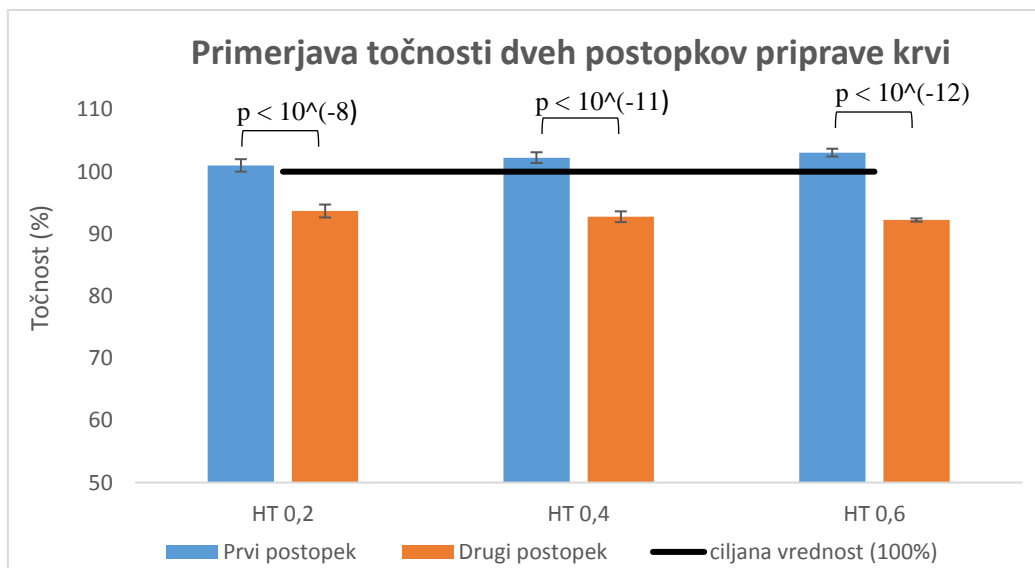
Slika 1: Umeritvena krivulja za hemin v območju od 2-20 mg/dl



Slika 2: Umeritvena krivulja za hemin v območju od 20-200 mg/dl

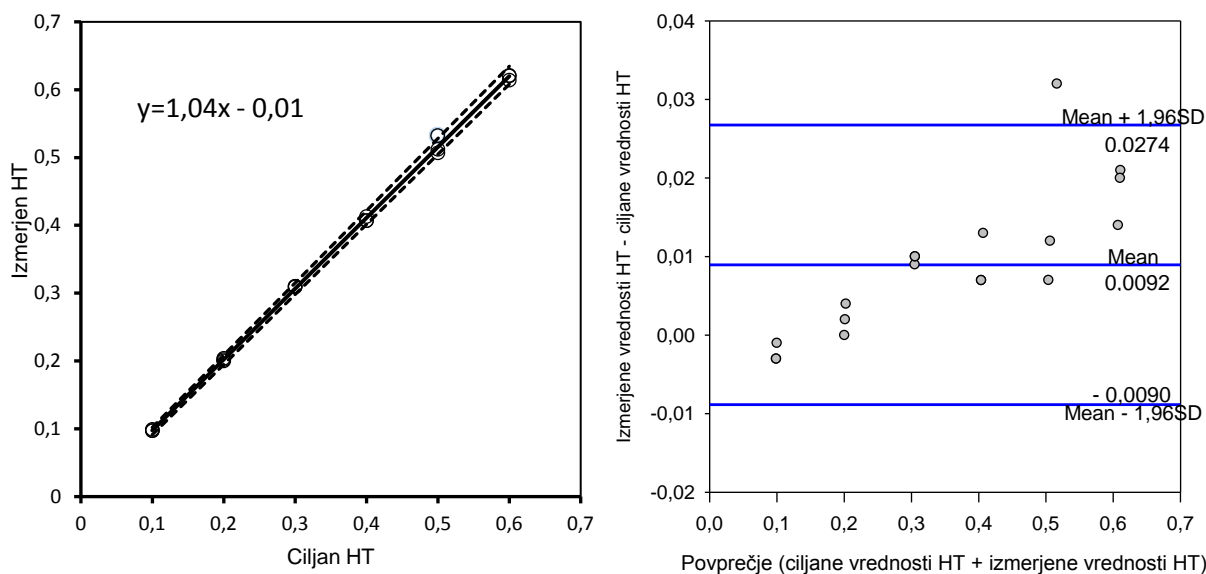
5.2. Priprava krvi z različnimi hematokriti

Pri izboru primernejšega postopka za pripravo krvnih vzorcev z različnimi HT smo upoštevali točnost pripravljene HT in praktičnost samega postopka priprave krvnih vzorcev z različnimi hematokriti. Rezultati statistične primerjave med vrednostmi HT pripravljene po prvem postopku (dodajanje in odvzemanje plazme) in teoretičnimi vrednostmi, so pokazali da med vrednostmi HT ni statičnih razlik. Prav tako, ni bilo razlik med primerjavo vrednosti HT, pripravljenih po drugem postopku (pipetiranje krvnih celic in plazme) in teoretično vrednostjo. Zato smo izračunali še točnosti obeh poskusov, ju primerjali med seboj ter dobili značilno razliko med obema postopkoma. Iz slike 3 je razvidno, da je za pripravo krvnih vzorcev z različnimi HT točnejši prvi postopek. Prvi postopek je optimalnejši tudi s stališča priprave vzorcev, saj smo se s poznanim začetnim HT, izognili težavnemu pipetiranju viskoznih krvnih celic.



Slika 3: Primerjava točnosti dveh postopkov priprave krvi

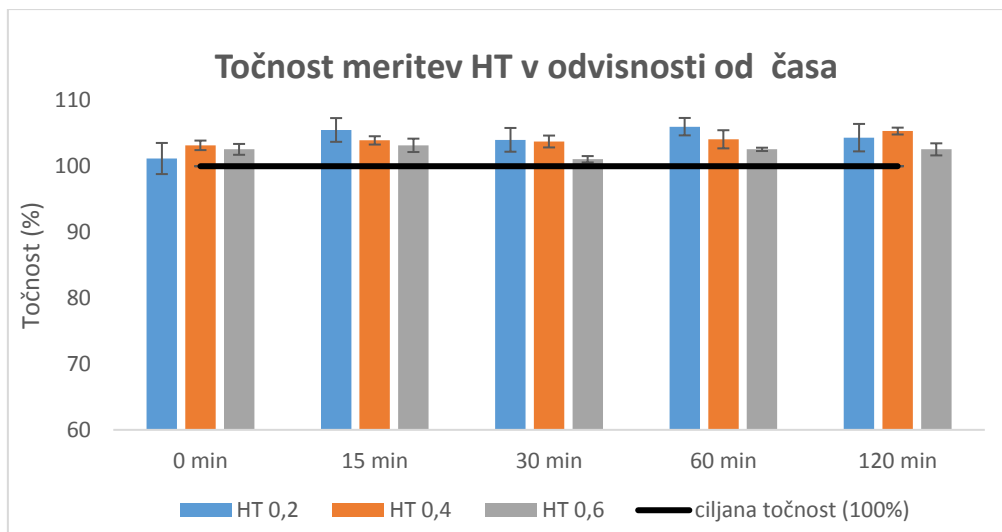
Da bi še dodatno potrdili ustreznost prvega postopka, smo ponovno pripravili krvne vzorce, tokrat še z dodatnimi in vmesnimi hematokriti v območju od 0,1 do 0,6. Rezultate meritev HT na hematološkem aparatu smo preverili s Passing-Bablok (PB) regresijo in Bland Altmanovem grafu (Slika 4). Enačba PB regresije $y = 1,04x - 0,01$ kaže na 4 % odstopanje meritev HT, z intervalom zaupanja 1,03-1,07 za naklon in -0,01 - 0,01 za odsek. Relativna standardna devianca meritev je varirala v območju od 0,61 % – 2, 56 % za posamezno vrednost HT. Iz Bland Altmanovega graf ugotovimo, da so izmerjene vrednosti HT v povprečju za 0,0092 večje od ciljne (teoretične) vrednosti.



Slika 4: Passing Bablok regresija in Bland Altmanov graf meritev vzorcev z različnim HT pripravljenih s prvim postopkom.

5.3. Vpliv časa inkubacije na točnost meritev HT

Rezultati statističnega testa, kjer smo primerjali točnosti meritev petih skupin oz. časovnih točk so pokazali, da med skupinami ni značilnih razlik ($p = 0,59$), čas torej ne vpliva na točnost meritev hematokrita. To je razvidno tudi iz Slike 5, ki prikazuje točnost meritev HT v odvisnosti od časa inkubacije.



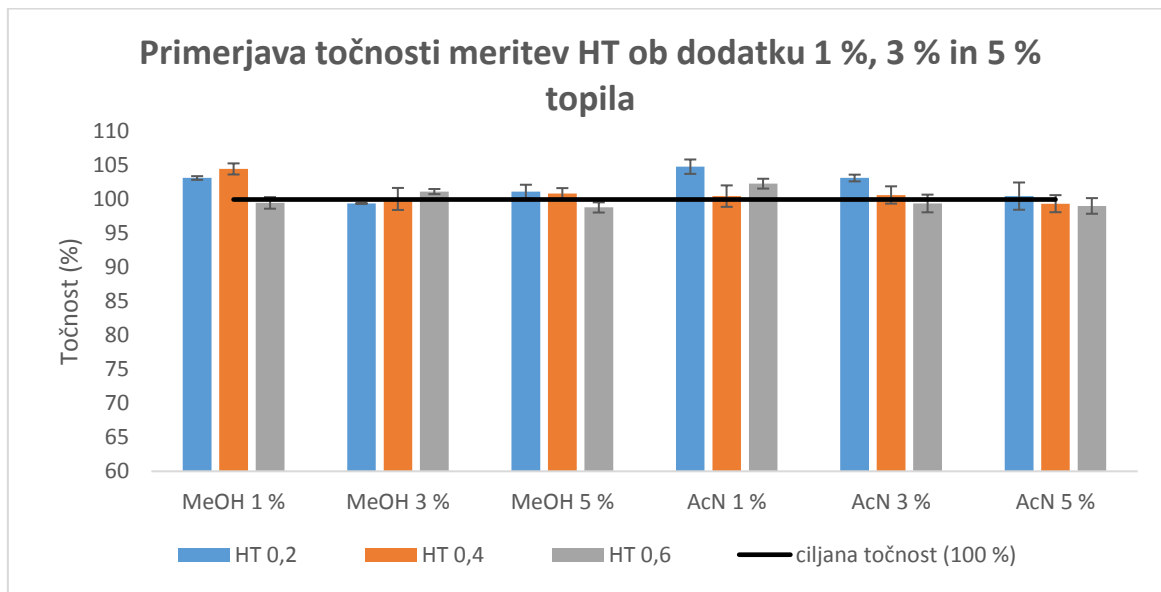
Slika 5: Točnost meritev HT v odvisnosti od časa

Pri tem poskusu bi bilo smiselno preveriti še kako čas inkubacije vpliva na hemolizo celic. Odvisnost hemolize od časa smo dodatno preverili pri naslednjem poskusu (vpliv topila na hemolizo).

5.4. Vpliv topila na točnost meritev HT in na hemolizo

5.4.1. Vpliv topila na točnosti meritev HT

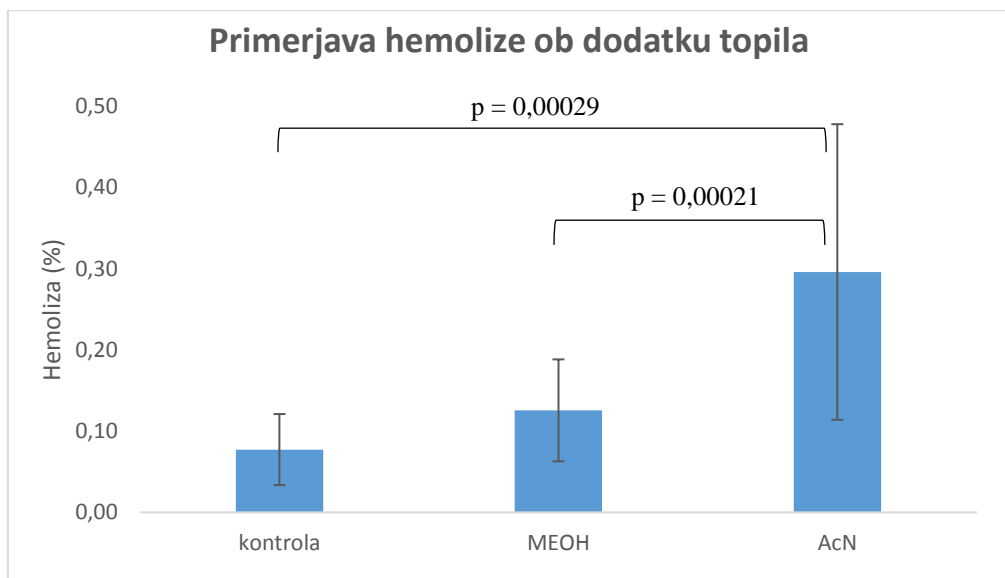
Na sliki 6 je prikazana primerjava točnosti meritev HT ob dodatku AcN in MeOH. Primerjava je pokazala, da dodatki AcN in MeOH ne vplivajo na točnost meritev HT neglede na začetno vrednost HT vzorcev ($p = 0,459$).



Slika 6: Primerjava točnosti meritev HT ob dodatku 1 %, 3 % in 5 % topila

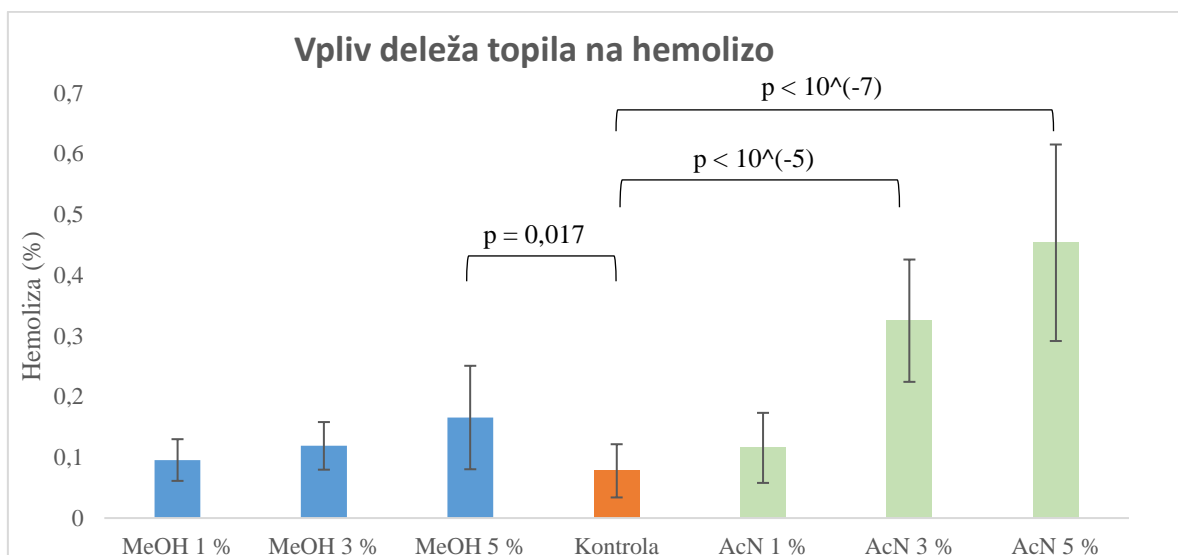
5.4.2. Vpliv topila na hemolizo

Pri statistični primerjavi hemolize treh skupin (kontrola, dodatek MeOH, dodatek AcN) smo ugotovili statistično razlikovanje med skupinami. Kot je razvidno iz slike 7, so se vrednosti hemolize statistično ($p < 0,05$) razlikovale med skupinama kontrola in dodatek AcN ter med skupinama dodatek MeOH in dodatek AcN. Rezultati torej kažejo, da AcN ob enakih pogojih povzroči značilno večji razpad celic kot MeOH.



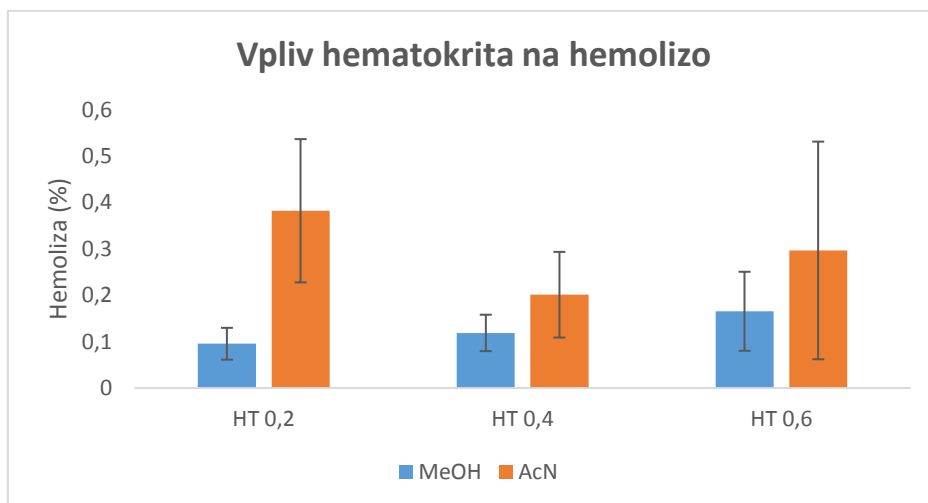
Slika 7: Primerjava hemolize ob dodatku topila

Pri primerjavi vpliva deleža topila na hemolizo (slika 8), smo ugotovili, da se pojavijo značilne razlike s kontrolno skupino ob dodatku 5 % metanola ter dodatku 3 % in 5 % acetonitrila. Na podlagi teh rezultatov smo za varno mejo izbrali metanol v dodatku 3 % glede na končni volumen krvnih vzorcev. Da bi možnosti za hemolizo še dodatno zmanjšali, smo v nadaljevanju analite h krvnim vzorcem dodajali v raztopini MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v).



Slika 8: Vpliv deleža topila na hemolizo

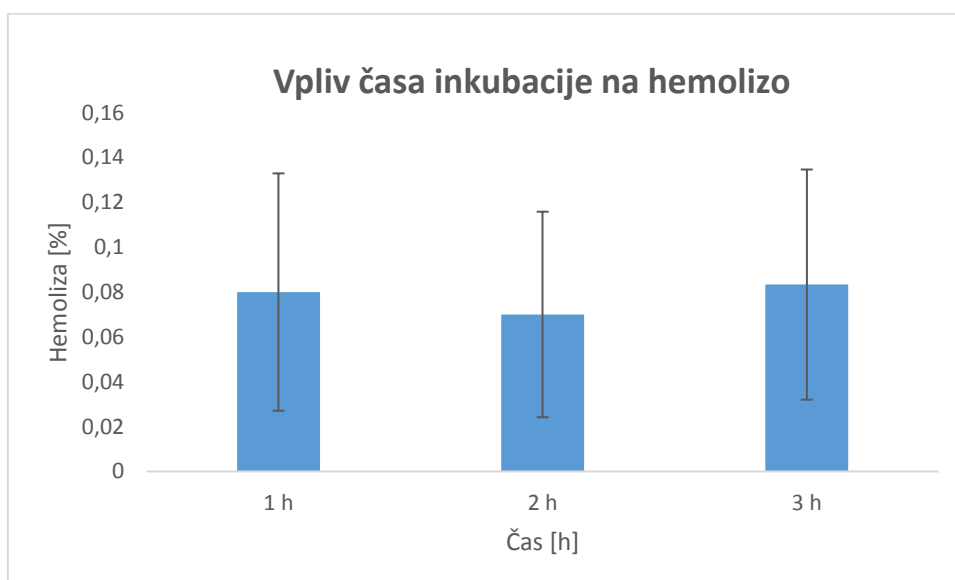
Preverili smo tudi kako različen hematokrit vpliva na hemolizo (Slika 9), tako da smo za posamezno vrednosti HT združili vse deleže topila. Rezultati so pokazali, da med hematokriti ni statističnih razlik ($p = 0,094$).



Slika 9: Vpliv hematokrita na hemolizo

5.4.3. Vpliv časa na hemolizo

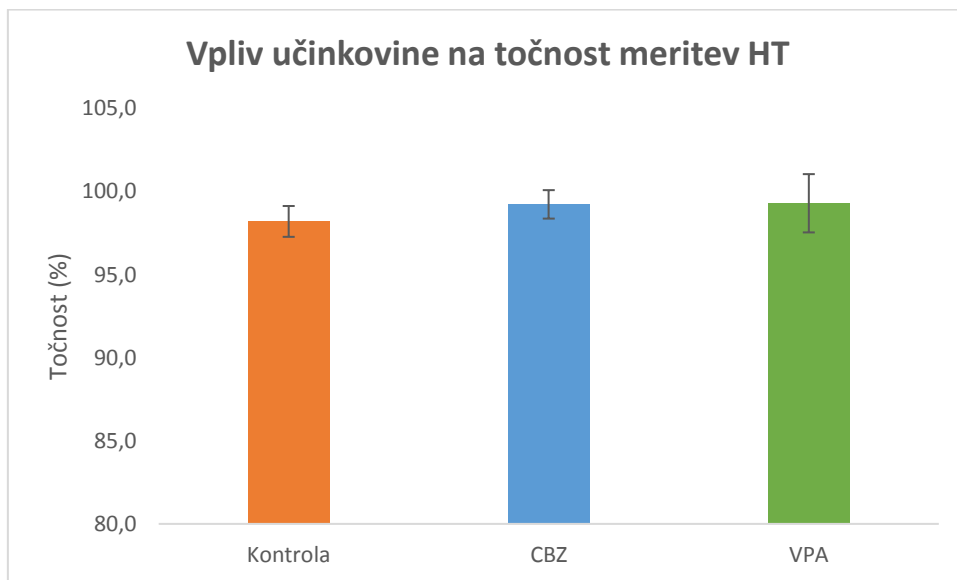
Na koncu smo pri kontrolni skupini preverili še vpliv časa na hemolizo (Slika 10). Vpliv smo lahko preverili zato, ker smo paralelke inkubirali z eno urnim časovnim zamikom, da smo v vmesnem času lahko pomerili vrednosti HT. Rezultati statističnega testa ANOVA so pokazali, da med paralelkami ni bilo razlik ($p = 0,388$).



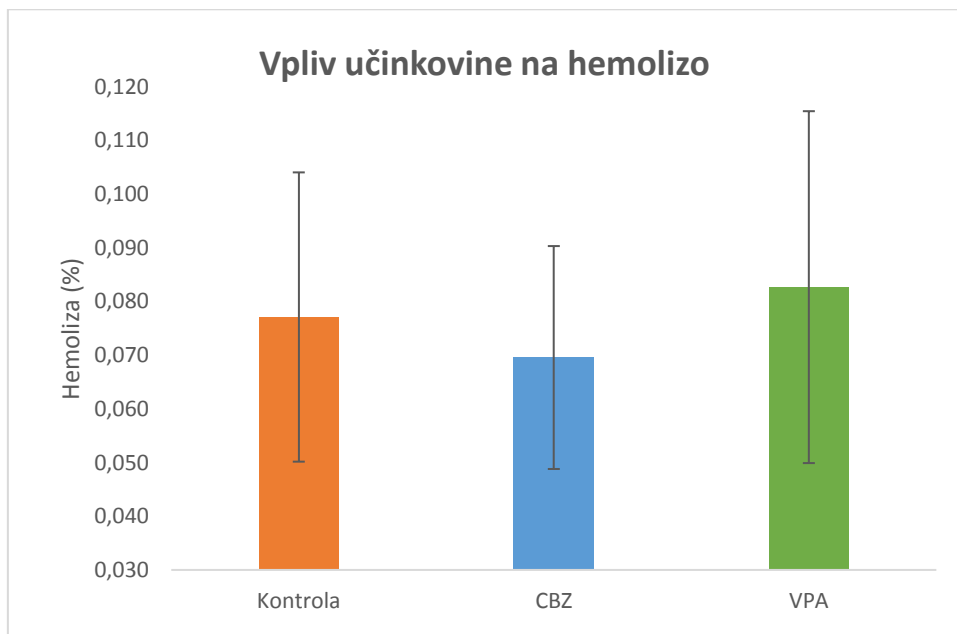
Slika 10: Vpliv časa inkubacije na hemolizo v kontrolni skupini

5.5. Vpliv učinkovine na točnost meritev HT in na hemolizo

Rezultati so pokazali, da ni statističnih razlik ($p = 0,599$) v točnosti meritev HT med tremi skupinami (Slika 11). Prav tako ni bilo razlik ($p = 0,179$) v hemolizi med tremi skupinami (Slika 12).

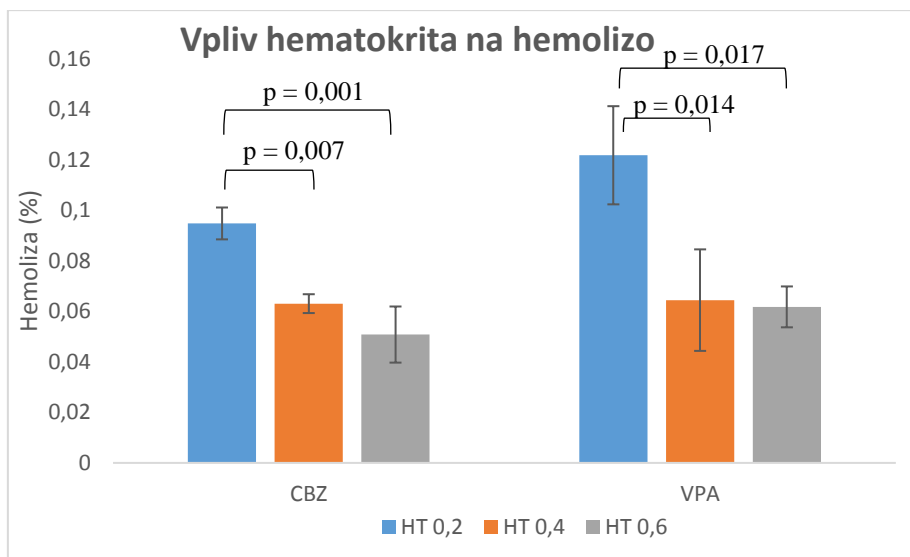


Slika 11: Vpliv učinkovine na točnost meritev HT



Slika 12: Vpliv učinkovine na hemolizo

Primerjali smo še vpliv hematokrita znotraj skupine z dodatkom VPA in znotraj skupine z dodatkom CBZ na hemolizo. Ugotovili smo, da je pri obeh dodatkih učinkovine, hemoliza značilno večja pri najmanjšem hematokritu (Slika 13).

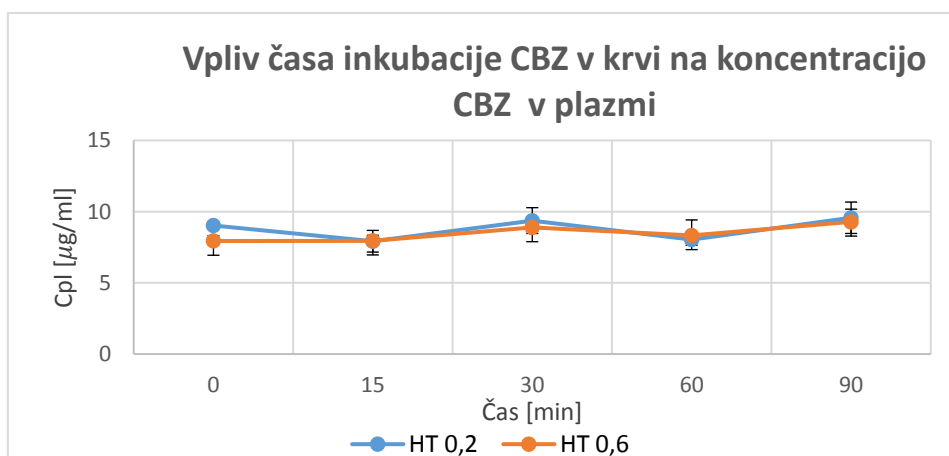


Slika 13: Vpliv vrednosti HT na hemolizo

5.6. Določitev optimalnega inkubacijskega časa za vzpostavitev ravnotežja

- Karbamazepin

Kot je razvidno iz slike 14, med časovnimi točkami ni bilo značilnih razlik tako pri HT 0,2, kot tudi pri HT 0,6, kar nakazuje na takojšnje vzpostavitev ravnotežja koncentracije med krvnimi celicami in plazmo. Kljub temu smo se odločili, da bomo za nadaljnje poskuse vzorce inkubirali 60 minut.

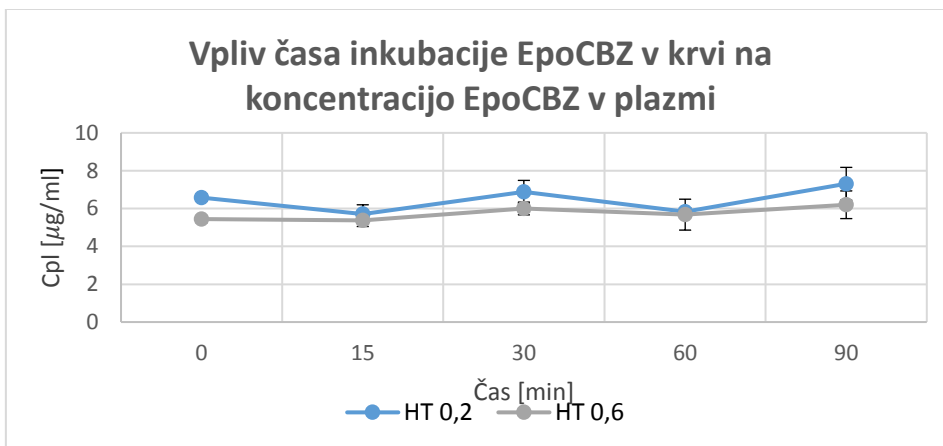


Slika 14: Vpliv časa inkubacije CBZ v krvi na koncentracijo CBZ v plazmi.

- Epokarbamazepin

Rezultati statističnega testa so pokazali, da med časovnimi točkami ni razlik pri HT 0,6. Pri HT 0,2 pa se pojavijo značilne razlike ($p = 0,043$) med časovnima točkama 15 in 90 minut.

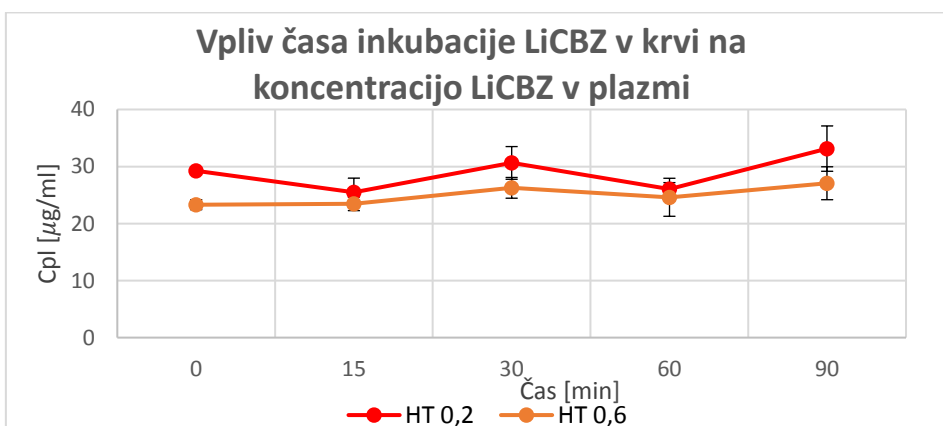
Glede na to, da se razlikujeta točki v 2. in 5., ne pa tudi 4. in 5. oz. 2. in 4. časovni meritvi, sklepamo da je do ravnotežja prišlo že pri točki 4 (60 minut), ki smo jo zato izbrali za primeren čas inkubacije pri nadaljnjih poskusih. Potek vzpostavitve ravnotežja pri EpoCBZ je prikazana na sliki 15.



Slika 15: Vpliv časa inkubacije EpoCBZ v krvi na koncentracijo EpoCBZ v plazmi.

- Likarbazepin

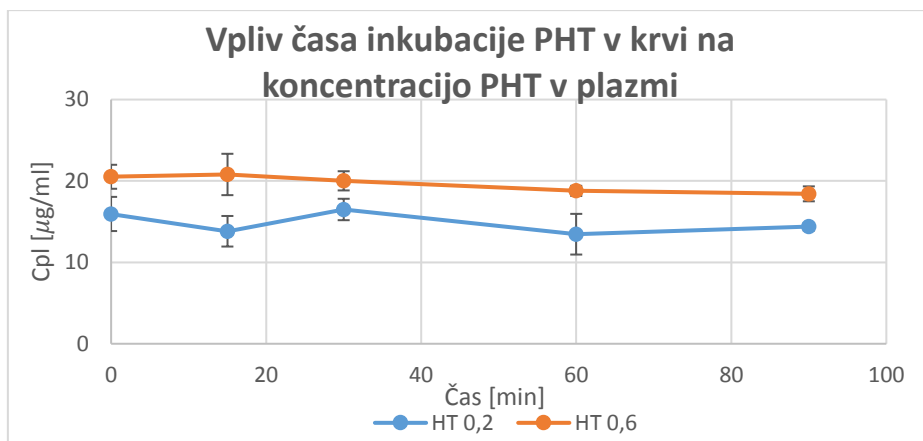
Rezultati statističnega testa so pokazali, da med časovnimi točkami ni razlik pri HT 0,6. Pri HT 0,2 pa se pojavijo značilne razlike ($p = 0,039$) med časovnima točkama 15 in 90 minut (Slika 16). Podobno kot pri metabolitu EpoCBZ, tudi pri LiCBZ sklepamo, da do ravnotežja pride že po 60 minutah.



Slika 16: Vpliv časa inkubacije LiCBZ v krvi na koncentracijo LiCBZ v plazmi.

- Fenitoin

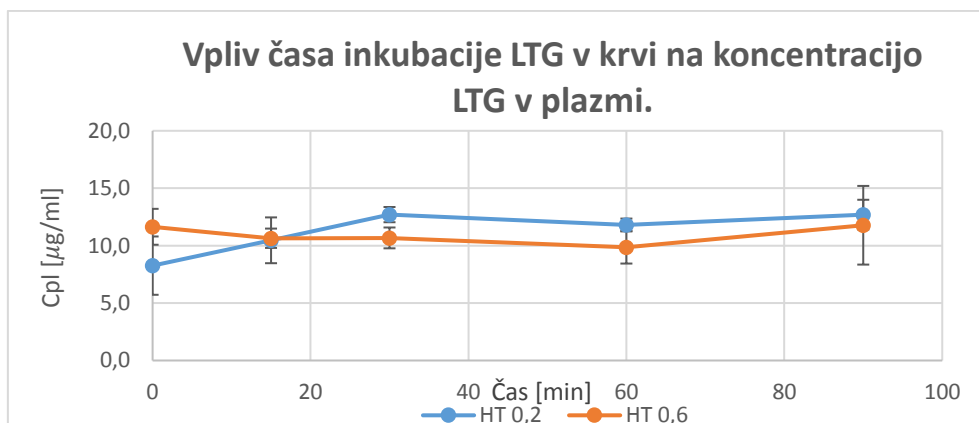
Med časovnimi točkami ni bilo značilnih razlik tako pri HT 0,2, kot tudi pri HT 0,6 (slika 17). Kljub očitni takojšnji vzpostavitvi ravnotežja, smo v nadaljevanju PHT inkubirali 60 minut.



Slika 17: Vpliv časa inkubacije PHT v krvi na koncentracijo PHT v plazmi.

- Lamotrigin

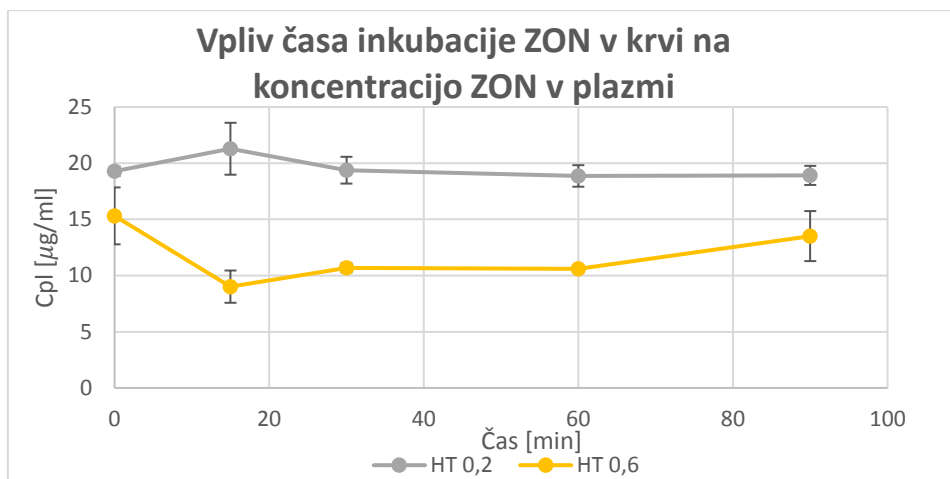
Med časovnimi točkami ni bilo značilnih razlik pri nobenem izmed dveh HT (Slika 18). Klub temu lahko iz slike 18 pri HT 0,2 opazimo naraščanje plazemske koncentracije do 30 minute inkubacije in šele potem vzpostavitev ravnotežja. Na podlagi grafa smo se odločili, da je optimalni čas inkubacije 60 minut.



Slika 18: Vpliv časa inkubacije LTG v krvi na koncentracijo LTG v plazmi.

- Zonisamid

Rezultati statističnega testa so pokazali, da med časovnimi točkami ni razlik pri HT 0,6. Pri HT 0,2 pa se pojavijo značilne razlike ($p = 0,007$) med časovnima točkama 15 in 30 minut (Slika 19). Glede na statistične rezultate in spodnjo sliko smo se odločili, da bomo v nadaljevanju tudi zonisamid inkubirali 60 minut.



Slika 19: Vpliv časa inkubacije ZON v krvi na koncentracijo ZON v plazmi.

5.7. Določitev porazdelitvenih koeficientov K in R

Porazdelitvena koeficienta K in R smo določili tako, da smo upoštevali parametre iz prejšnjih poskusov pripravili vzorce krvi z dvema HT (0,2 in 0,6) ter jih obogatili z izbranimi učinkovinami oz. metabolitom v najvišji in najnižji terapevtski koncentraciji. Vsakemu izmed vzorcev smo določili koncentracijo učinkovine v plazmi (C_{PL}) ter v DBS (C_B). Iz dobljenih koncentracij smo izračunali parametra R (C_B/C_{PL}) in K po enačbi 4:

$$K_{BC/PL} = \frac{C_B - (C_{PL} * (1 - HT))}{(HT * C_{PL})}$$

enačba 4

V nadaljevanju so za vsako učinkovino oz. metabolit prikazani rezultati meritev koncentracij v plazmi in DBS ter izračuni koeficientov K in R. Za vsako substanco smo tako dobili 4 vrednosti K iz katerih smo izračunali tudi povprečno vrednost. Da bi preverili ustreznost naše določitve koeficienta K smo za vsako meritev koncentracije v DBS (C_B), s pomočjo povprečne vrednosti K in enačbe 4, izračunali teoretično plazemsko koncentracijo ($C_{PL\ izr}$). Le-to smo primerjali z izmerjeno plazemsko koncentracijo ($C_{PL\ izm}$). Primer rezultatov takšnega izračuna je v preglednici XIX.

Nato smo za vsako meritev koncentracije v DBS (C_B), teoretično vrednost plazemske koncentracije ($C_{PL\ izr}$) izračunali še pri vsakem od preostalih treh koeficientih K, ki smo jih določili pri posamezni učinkovini oz. metabolitu. Tudi to vrednost smo primerjali z izmerjeno plazemsko koncentracijo ($C_{PL\ izm}$). Primer rezultatov takšnega izračuna je v

preglednici XX. Ujemanje med izračunano in izmerjeno plazemsko koncentracijo smo ovrednotili za dobro, če se vrednosti nista razlikovali za več kot je dovoljeno po bioanaliznih smernicah ($\pm 15\%$).

5.7.1. Karbamazepin

Iz preglednice XIX lahko razberemo, da povprečna vrednost koeficienta K pri CBZ ustrezno korelira s koncentracijama v plazmi in v DBS, saj dobimo dobro ujemanje med izmerjeno in izračunano plazemsko koncentracijo. Poleg tega iz preglednice XX opazimo, da koncentracija in hematokrit nimata vpliva na koeficient K, saj smo dobili dobro ujemanje med izračunano in izmerjeno plazemsko koncentracijo, neodvisno od tega, katero vrednost K smo uporabili.

Preglednica XIX: CBZ - Rezultati določitve K in R

	C_B (mg/l)	C_{PL} izm. (mg/l)	$R_{B/PL}$	$K_{BC/PL}$	povprečni $K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm (%)
0,2 min	3,34	3,32	1,01	1,04	0,99	3,35	101,0
0,6 min	2,99	3,11	0,96	0,94		3,02	97,0
0,2 max	10,70	10,96	0,98	0,89		10,75	98,1
0,6 max	10,60	10,14	1,05	1,08		10,71	105,7

Preglednica XX: CBZ - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.

C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.	C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.
HT 0,2 min koncentracija					HT 0,6 min koncentracija				
3,34	0,2	0,94	3,39	102,1	2,99	0,6	1,04	2,93	94,1
	0,2	0,89	3,42	103,0		0,6	0,89	3,20	102,8
	0,2	1,08	3,29	99,2		0,6	1,08	2,86	91,8
HT 0,2 max koncentracija					HT 0,6 max koncentracija				
10,72	0,2	1,04	10,64	97,1	10,62	0,6	1,04	10,39	102,5
	0,2	0,94	10,86	99,1		0,6	0,94	11,05	109,0
	0,2	1,08	10,55	96,3		0,6	0,89	11,36	112,0

5.7.2. Epokarbamazepin

Iz preglednice XXI ugotovimo, da je ujemanje med vrednostmi plazme pri HT 0,2 dobro, pri HT 0,6 pa so rezultati izven meja dopustnosti ($\pm 15\%$). Podobno lahko opazimo tudi pri

preglednice XXII. Pri podrobnem pregledu opazimo, da se pri hematokritu 0,6 plazemske vrednosti ujemajo le takrat, ko je za izračun uporabljen K, določen pri HT 0,6. To bi lahko pomenilo, da je vrednost koeficienta K pri EpoCBZ odvisna od hematokrita.

Preglednica XXI: EpoCBZ - Rezultati določitve K in R

	C_B (mg/l)	C_{PL} izm. (mg/l)	$R_{B/PL}$	$K_{BC/PL}$	povprečni $K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm (%)
0,2 min	1,43	1,65	0,87	0,35	0,64	1,55	93,7
0,6 min	1,56	1,49	1,05	1,08		1,99	133,6
0,2 max	5,17	6,38	0,81	0,05		5,57	87,4
0,6 max	5,83	5,56	1,05	1,08		7,44	133,8

Preglednica XXII: EpoCBZ - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.

C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.	C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.
HT 0,2 min koncentracija					HT 0,6 min koncentracija				
1,434	0,2	1,08	1,41	85,6	1,56	0,6	0,35	2,56	172,3
	0,2	0,05	1,77	107,2		0,6	0,05	3,60	242,4
	0,2	1,08	1,41	85,5		0,6	1,08	1,48	99,9
HT 0,2 max koncentracija					HT 0,6 max koncentracija				
5,168	0,2	0,35	5,95	93,3	5,83	0,6	0,35	9,60	172,5
	0,2	1,08	5,09	79,8		0,6	1,08	5,57	100,1
	0,2	1,08	5,09	79,8		0,6	0,05	13,50	242,6

5.7.3. Likarbazepin

Iz preglednice XXIII lahko razberemo, da povprečna vrednost koeficienta K pri LiCBZ ustrezno korelira s koncentracijama v plazmi in v DBS, saj dobimo dobro ujemanje med izmerjeno in izračunano plazemsko koncentracijo. Poleg tega v preglednici XXIV opazimo, da koncentracija in hematokrit nimata vpliva na koeficient K pri nižjih hematokritih (0,2), saj smo dobili dobro ujemanje med izračunano in izmerjeno plazemsko koncentracijo, neodvisno od tega, katero vrednost K smo uporabili. Pri hematokritu 0,6 pa znova opazimo boljše ujemanje za tiste koncentracije, pri katerih smo vrednost K za izračun plazemskih koncentracij, izbrali pri enakem HT.

Preglednica XXIII: LiCBZ - Rezultati določitve K in R

	C_B (mg/l)	C_{PL} izm. (mg/l)	$R_{B/PL}$	$K_{BC/PL}$	povprečni $K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm (%)
0,2 min	2,34	2,45	0,95	0,77	0,96	2,36	96,1
0,6 min	2,12	1,88	1,13	1,21		2,17	115,3
0,2 max	32,60	33,82	0,96	0,82		32,84	97,1
0,6 max	31,97	31,02	1,03	1,05		32,67	105,3

Preglednica XXIV: LiCBZ - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.

C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.	C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.
HT 0,2 min koncentracija					HT 0,6 min koncentracija				
2,34	0,2	1,21	2,25	91,6	2,12	0,6	0,77	2,46	130,6
	0,2	0,82	2,43	99,0		0,6	0,82	2,38	126,4
	0,2	1,05	2,32	94,5		0,6	1,05	2,06	109,4
HT 0,2 max koncentracija					HT 0,6 max koncentracija				
32,60	0,2	0,77	34,15	101,0	31,97	0,6	0,77	37,01	119,3
	0,2	1,21	31,27	92,5		0,6	1,21	28,34	91,4
	0,2	1,05	32,27	95,4		0,6	0,82	35,83	115,5

5.7.4. Fenitoin

Iz razpredelnice XXV ugotovimo, da povprečna vrednost koeficienta K ustrezno korelira s koncentracijama v plazmi in v DBS, saj dobimo dobro ujemanje med izmerjeno in izračunano plazemsko koncentracijo. Poleg tega iz preglednica XXVI ugotovimo, da koncentracija in hematokrit nimata vpliva na koeficient K, saj smo dobili dobro ujemanje med izračunano in izmerjeno plazemsko koncentracijo, neodvisno od tega, katero vrednost K smo uporabili. Malenkost pod mejo dovoljenega odstopanja ($\pm 15\%$) sta le dve vrednosti.

Preglednica XXV: PHT - Rezultati določitve K in R

	C_B (mg/l)	C_{PL} izm. (mg/l)	$R_{B/PL}$	$K_{BC/PL}$	povprečni $K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm (%)
0,2 min	10,36	10,19	1,02	1,08	0,84	10,70	105,0
0,6 min	11,20	12,87	0,87	0,78		12,39	96,3
0,2 max	20,93	22,04	0,95	0,75		21,62	98,1
0,6 max	22,73	26,83	0,85	0,75		25,15	93,7

Preglednica XXVI: PHT - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.

C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.	C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.
HT 0,2 min koncentracija					HT 0,6 min koncentracija				
10,36	0,2	0,78	10,83	106,2	11,20	0,6	1,08	10,67	83,0
	0,2	0,75	10,91	107,1		0,6	0,75	13,21	102,7
	0,2	0,75	10,92	107,1		0,6	0,75	13,22	102,8
HT 0,2 max koncentracija					HT 0,6 max koncentracija				
20,93	0,2	1,08	20,59	93,4	22,73	0,6	1,08	21,66	80,7
	0,2	0,78	21,87	99,2		0,6	0,78	26,11	97,3
	0,2	0,75	22,05	100,0		0,6	0,75	26,80	99,9

5.7.5. Lamotrigin

Iz razpredelnice XXVII lahko razberemo, da povprečna vrednost koeficienta K ustrezno korelira s koncentracijama v plazmi in v DBS, saj dobimo dobro ujemanje med izmerjeno in izračunano plazemsko koncentracijo. Poleg tega v preglednici XXVIII opazimo, da koncentracija in hematokrit nimata vpliva na koeficient K, saj smo dobili dobro ujemanje med izračunano in izmerjeno plazemsko koncentracijo. Dve vrednosti sta izven dovoljene meje odstopanja.

Preglednica XXVII: LTG - Rezultati določitve K in R

	C_B (mg/l)	C_{PL} izm. (mg/l)	$R_{B/PL}$	$K_{BC/PL}$	povprečni $K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm (%)
0,2 min	2,08	1,75	1,19	1,93	1,48	1,90	108,3
0,6 min	2,02	1,54	1,32	1,53		1,57	102,3
0,2 max	12,43	12,06	1,03	1,16		11,35	94,1
0,6 max	11,48	9,77	1,17	1,29		8,93	91,3

Preglednica XXVIII: LTG - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.

C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.	C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.
HT 0,2 min koncentracija					HT 0,6 min koncentracija				
2,08	0,2	1,53	1,88	107,4	2,02	0,6	1,93	1,30	84,4
	0,2	1,16	2,02	115,1		0,6	1,16	1,85	120,4
	0,2	1,29	1,97	112,1		0,6	1,29	1,72	112,0
HT 0,2 max koncentracija					HT 0,6 max koncentracija				

12,43	0,2	1,93	10,47	86,9	11,48	0,6	1,93	7,36	75,3
	0,2	1,53	11,24	93,3		0,6	1,53	8,72	89,3
	0,2	1,29	11,75	97,4		0,6	1,16	10,50	107,5

5.7.6. Zonisamid

Pri zonisamidu opazimo neujemanje med izračunano in izmerjeno plazemsko koncentracijo tako pri izračunanih plazemskih koncentracijah iz povprečnega K (preglednica XXIX), kot tudi pri izračunanih iz posamezne vrednosti K (preglednica XXX). Glede na to, da med rezultati ni videti nobene povezave, bi lahko pri zonisamidu zaključili, da je koeficient za pretvorbo koncentracij iz polne krvi v plazemsko koncentracijo, odvisen od vrednosti hematokrita in dodane koncentracije h krvnim vzorcem.

Preglednica XXIX: ZON - Rezultati določitve K in R

	C_B (mg/l)	C_{PL} izm. (mg/l)	$R_{B/PL}$	$K_{BC/PL}$	povprečni $K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm (%)
0,2 min	9,80	3,22	3,04	11,22	8,36	3,96	123,1
0,6 min	10,36	0,93	11,11	17,85		1,91	205,1
0,2 max	34,71	32,47	1,07	1,35		14,04	43,2
0,6 max	34,72	15,63	2,22	3,03		6,41	41,0

Preglednica XXX: ZON - Izračunane plazemske koncentracije in primerjava z izmerjenimi.

C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.	C_B (mg/l)	HT	$K_{BC/PL}$	C_{PL} izr. (mg/l)	C_{PL} izr. / C_{PL} izm.
HT 0,2 min koncentracija					HT 0,6 min koncentracija				
9,80	0,2	17,85	2,24	69,7	10,36	0,6	11,22	1,45	155,7
	0,2	1,35	9,17	284,8		0,6	1,35	8,59	920,4
	0,2	3,03	6,97	216,4		0,6	3,03	4,67	500,3
HT 0,2 max koncentracija					HT 0,6 max koncentracija				
34,71	0,2	11,22	11,40	35,1	34,72	0,6	11,22	4,87	31,1
	0,2	17,85	7,94	24,5		0,6	17,85	3,13	20,0
	0,2	3,03	24,67	76,0		0,6	1,35	28,76	184,0

6 RAZPRAVA

6.1. Meritve hemoglobina v plazmi

Razvito metodo za določanje hemoglobina v plazmi na mikrotitrskih ploščicah smo izboljšali z uporabo dvakrat manjšega volumna vzorcev in poenostavili s krajšim časom inkubiranja vzorcev z reagentom. Poleg tega za inkubiranje nismo potrebovali mešalnika. Glede na to, da smo metodi spremenili kar nekaj ključnih parametrov, bi bilo smiselno metodo na novo validirati po smernicah za bioanalizne metode Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). Kljub temu, da nova metoda ni bila validirana, smo dobili dobro ponovljivost med meritvami. Pri umeritveni krivulji smo točnost zagotovili z dvema umeritvenima krivuljama v dveh koncentracijskih območjih, ki sta vsebovali standarde merjene v triplikatu. Med samim postopkom nam je težavo predstavljal reagent, ki je vseboval viskozen Triton. Ta se je med dodajanjem k vzorcem močno penil, zato je bilo potrebno pazljivo pipetiranje reagenta. To smo storili tako, da smo vse nastavke multikanalne pipete med pipetiranjem tesno naslonili ob stene vdolbin mikrotitrne ploščice.

6.2. Meritve hematokrita

Meritve HT smo izvajali v zdravstvenem domu za študente na Aškerčevi ulici. Lokacija hematološkega aparata ni bila idealna, saj bi lahko že prenašanje in daljši čas do aparata vplivala na razpad določenega deleža celic. Poleg tega je bil aparat prilagojen za meritve iz večjih epruvet (4-5ml), zaradi česar smo morali iz naših 1,5 ml plastičnih epruvet vsebino krvnih vzorcev prenesti v večje epruvete in jih po koncu vsake meritve prenesti nazaj v 1,5 ml plastične epruvete, saj smo te vzorce kasneje še centrifugirali in določili vrednost hemoglobina v plazmi. Dodatno pipetiranje bi prav tako lahko vplivala na hemolizo.

Meritve HT so bile smiselne le pri poskusu primerjave dveh postopkov priprave krvi. Pri naslednjih poskusih (vpliv časa, topila in učinkovine) nam meritve niso bile v pomoč pri ocenjevanju hemolize, saj so bile razlike premajhne, da bi jih zaznali v meritvah HT. Kljub temu smo si z izpisi, ki smo jih dobili ob merjenju HT, pomagali pri izračunu hemolize iz meritev Hb v plazmi (enačba 3, stran 12). Za izračune smo namreč potrebovali tudi celokupno koncentracijo Hb v krvi, ki smo jo dobili izpisano poleg meritev HT.

6.3. Primerjava postopkov priprave krvi

Pri primerjavi naših rezultatov PB regresije s podatki iz literature (26) ugotovimo, da so naše meritve nekoliko slabše točne (~ 4 %), kar je vsaj delno posledica manjšega števila paralelek pri posamezni vrednosti HT. Pri našem poskusu, smo merili v treh paralelkah, med tem ko so pri primeru iz literature HT določali z devetimi paralelkami. Povprečna relativna standardna deviacija (RSD) je pri našem poskusu nižja, kar pomeni da so naše vrednosti HT med seboj manj razlikujejo. Intervala zaupanja (IZ) sta med obema poskusoma zelo primerljiva. Podrobnejša primerjava je podana v preglednici XXXI.

Preglednica XXXI: Primerjava postopkov priprave krvi z dodajanjem in odvzemanjem plazme

	Literatura (26)	Rezultati našega poskusa
Enačba PB regresije	$y = 1,00x - 0,00$	$y = 1,04x - 0,01$
IZ za naklon	0,95 – 1,03	1,03 - 1,07
IZ za odsek	-0,01 – 0,01	-0,01 – 0,01
RSD (na vrednost HT)	2,13% – 3,65 %	0,61 % – 2, 56 %

6.4. Vpliv časa inkubacije na hemolizo

Povprečna življenjska doba eritrocitov v krvnem obtoku je 120 dni. Glede na to, da je število vseh eritrocitov v krvi približno $25 \cdot 10^{12}$, vsak dan odmre približno $2,1 \cdot 10^{11}$ celic kar je 0,83 % vseh celic v krvnem obtoku (34). Teoretično tako v eni uri odmre 0,035 % celic, v dveh pa 0,070 %. Kljub nizki razliki v hemolizi pri tem časovnem intervalu, smo pričakovali, da bodo drugačni pogoji, ki jih je kri deležna po odvzemu v plastične epruvete, vplivali na hitrejši razpad krvnih celic. Z našim poskusom smo dokazali, da v časovnem intervalu treh ur ni bilo značilnih razlik v hemolizi. Pri pregledu literature nismo našli podobnega poskusa, kjer bi hemolizo skozi čas ocenjevali pri sobni temperaturi.

6.5. Vpliv topila na hemolizo

Organska topila se lahko po tem ko jih dodamo h krvnim vzorcem vrinejo v celično membrano. S polarnim delom tvorijo vezi na površini membrane, z nepolarnim delom pa se povežejo s hidrofobno sredico fosfolipidnega dvosloja. Daljša kot je nepolarna veriga, bolj

se molekule topil porazdeljujejo v celično membrano. Porazdeljevanje je odvisno tudi od koncentracije organskega topila. Pri nizkih koncentracijah se organske molekule zadržujejo po večini na zunanem delu membrane. S povečevanjem deleža topila pa molekule vse bolj prehajajo v sredico in povzročijo povečano prepletanje lipidnih verig in povišano gostoto lipidov. S tem se zmanjša fluidnosti globljih plasti membrane, posledično so celice hitreje podvržene hemolizi (35).

Metanol se zaradi svoje kratke nepolarne verige v sredino celične membrane vrine šele pri visokih koncentracijah, zato je njegov učinek na fluidnost membrane in posledično hemolizo zelo majhen (35). Z našim poskusom, ki je pokazal značilno večjo hemolizo pri 5 % MeOH napram kontrolni skupini, smo določili spodnjo mejo, ko se MeOH začne porazdeljevati v sredico membrane.

Pri primerjavi fizikalnih lastnosti MeOH in AcN smo ugotovili, da je AcN nekoliko bolj nepolarno topilo, zato se pri enakih koncentracijah bolj porazdeljuje v celično membrano in zmanjšuje njeno fluidnost. Z našim poskusom smo določili, da se že pri dodatku 3 % acetonitrila, pojavi značilno večja hemolizo kot v kontrolni skupini.

V literaturi o DBS redko naletimo na delež organskega topila, ki so ga dodajali k krvnim vzorcem. Povečini se učinkovino dodaja v metanolu, acetonitrilu ali mešanici organskega topila in vode oz. pufru. Zasedili smo podatke, da je zaželen odstotek topila v krvnem vzorcu 1 % in priporočila, da se topila z analiti najprej posuši in šele nato k njim doda krvne vzorce. Ta korak je neprimeren za hlapne učinkovine (36,37). S poskusom smo dokazali, da metanol pri 3 % ne povzroči značilno večje hemolize v primerjavi s kontrolno skupino in da je dodatni korak sušenja topil nepotreben. Prav tako je nepotrebno dodajanje analitov v zelo majhnih deležih topil (1%), saj v tem primeru za dobro točnost potrebujemo več krvi.

6.6 Vpliv učinkovine na hemolizo

Učinkovini CBZ in VPA smo za poskus vpliva učinkovine na hemolizo izbrali na podlagi njune znane toksičnosti iz literature.

Najpogostejši neželeni učinki CBZ so učinki na centralni živčni sistem, prebavni trakt in kožo. Pogosti pa so tudi hematološki učinki. Preko vrivanja v celično membrano, CBZ vpliva na oksigencijo krvnih celic in konformacijsko spremembo hemoglobina. Poleg tega

CBZ vpliva tudi na fiziološko asimetričnost fosfolipidnega sloja ter tako povzroči manjšo stabilnost celičnih membran (38).

VPA je protiepileptična učinkovina pri kateri so največkrat poročali o toksičnih učinkih. Med njimi sta najpomembnejša teratogenost in hepatotoksičnost. VPA ima tudi hematološke učinke, saj povzroča nevtropenijo in trombocitopenijo ter zavira delovanje kostnega mozga in agregacijo trombocitov (39). Poleg tega VPA v celicah poveča koncentracijo reaktivnih kisikovih zvrsti, ki lahko porušijo fiziološko delovanje celice ter poškodujejo nukleinske kisline, celične proteine in lipide (40). Tudi terapevtska koncentracija VPA je med najvišjimi koncentracijami PEU, kar bi prav tako lahko doprineslo k povišani hemolizi.

Na osnovi zgornjih lastnosti, neželenih učinkov in učinkov na celice smo ocenili, da imata učinkovini VPA in CBZ med PEU največjo možnost za povzročitev hemolize. Predpostavili smo, da če pri njima ne bomo opazili hemolize, potem je tudi preostale obravnavane učinkovine ne bodo povzročile.

Učinkovini smo dodajali v 3 % mešanice metanola in vode v razmerju 1:1 (v/v), saj smo pri tem deležu metanola pri prejšnjem poskusu izključili možnost za nastanek hemolize.

Z našim poskusom smo pokazali, da ni statističnih razlik med hemolizo v vzorcih z dodano VPA, CBZ in kontrolo, kar pomeni da pri maksimalnih terapevtskih koncentracijah učinkovini še ne povzročata značilne lize krvnih celic. Naši rezultati so skladni z rezultati magistrske naloge *Nine Franko* (40), kjer so s testom metabolne aktivnosti MTS (((3-(4,2-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) določali maksimalne koncentracije, ki še niso toksične za celice po 24 urah. Te so 4 mM (576,8 mg/l) za VPA in 1mM (117,1 mg/l) za CBZ, kar je bistveno višje od njihovih maksimalnih terapevtskih koncentracij (100mg/l pri VPA in 12 mg/l pri CBZ).

Pri primerjavi vpliva različnih vrednosti HT na hemolizo smo odkrili, da je hemoliza pri obeh učinkovinah značilno večja pri najnižjem HT (0,2). S tem smo potrdili odvisnost hemolize od koncentracije učinkovine, saj je pri najnižjem HT razmerje med koncentracijo učinkovine in številom celic največje, zato razpade več celic kot pri višjih HT.

6.7. Čas inkubacije do vzpostavitve ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo

Krvnim vzorcem smo dodali učinkovine v maksimalnih terapevtskih koncentracijah. Predpostavili smo, da če se bo ravnotežje v določenem času vzpostavilo pri največji množini molekul, potem bo ta čas zadostoval tudi za nižje koncentracije. Ugotovili smo, da porazdeljevanje med plazmo in krvnimi celicami poteka zelo hitro, saj pri večini preiskovanih učinkovin ni razlik niti med časovni točkama 0 in 15 minut. Pri tem je potrebno poudariti, da čas 0 minut pomeni le čas inkubacije, ki ni enak dejanskemu času porazdeljevanja, ki poteka od dodatka učinkovine krvnim vzorcem do ločitve plazme v nove plastične epruvete. Ocenili smo, da postopki mešanja obogatenih krvnih vzorcev, centrifugiranja in ločevanja plazme od celic potekajo približno 10 minut, kar je dovolj časa za porazdeljevanje učinkovin v celice. Iz statističnih primerjav smo ugotovili, da so značilne razlike v prvih 15 minutah inkubacije pojavijo le pri HT 0,6 pri učinkovini zonisamid.

Tudi literaturni podatki v večini primerov kažejo na zelo hitro porazdeljevanje in vzpostavitev ravnotežja. Izjema so nekatere učinkovine z visoko afiniteto do celic, na primer topiramid, ciklosporin in klortalidon (22).

V našem naboru učinkovin je zonisamid edini z visoko afiniteto do eritrocitov. Zaradi intenzivnejšega prehajanja učinkovine v notranjost krvnih celic, je za vzpostavitev ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo potrebno več časa, kar smo dokazali tudi z našim poskusom. Poleg tega se pri določeni koncentraciji učinkovine z visoko afiniteto do celic pojavi nasičenje, ki vpliva na variabilnost koeficienta porazdeljevanja med krvnimi celicami in plazmo. Pri nižjih koncentracijah je koeficient višji, ko pa se pojavi nasičenje vrednost koeficienta upade. Glede na to, da smo za vse obravnavane učinkovine čas inkubacije do vzpostavitve ravnotežja določali pri najvišjih terapevtskih koncentracijah, bi bilo v primeru zonisamida smiselno poskus ponoviti še pri najnižji terapevtski koncentraciji. S tem bi preverili ali variabilnost koeficienta vpliva tudi na čas inkubacije do vzpostavitve ravnotežja med krvnimi celicami in plazmo.

6.8. Določitev porazdelitvenih koeficientov K in R

V preglednici XXXII so prikazane povprečne vrednosti izračunanih porazdelitvenih koeficientov K in R za posamezen analit in primerjava z vrednostmi, ki smo jih našli v literaturi.

Preglednica XXXII: Primerjava vrednosti iz literature (12,23) in naših rezultatov

	Vrednosti iz literature (12,23)	Naši rezultati (povprečna vrednost)
--	---------------------------------	-------------------------------------

	K	R	K	R
CBZ	1,09	/	0,99	1,00
EpoCBZ	1,53	/	0,64	0,94
LiCBZ	1,1	1,25	0,96	1,02
PHT	0,29	1,33	0,84	0,92
LTG	1,57	2	1,48	1,18
ZON	15 oz. 3*	/	14,54 oz. 2,19*	7,08 oz. 1,65

* Koeficient je odvisen od koncentracije analita, pri nižji koncentraciji analita je višji in obratno

Pri karbamzepinu smo dobili dobro ujemanje med našimi rezultati in podatki iz literature. Pri različnih koncentracijah in hematokritih ni bilo razlik med določitvami vrednosti K in R. Glede na to, da sta obe vrednosti približno 1, se CBZ enakomerno porazdeljuje med obema krvnima slojema.

Epokarbamazepin je glavni metabolit karbamazepina, njuni kemijski strukturi sta si zato zelo podobni. Pri primerjavi izračunanih vrednosti porazdelitvenega koeficienta smo ugotovili, da je EpoCBZ manj lipofilen, zato se slabše porazdeljuje v celično membrano in v krvne celice. Na podobno kažeta tudi določeni povprečni vrednosti koeficienta K določene v naših poskusih (Preglednica XXX). Pri EpoCBZ smo opazili tudi veliko nihanje vrednosti K v odvisnosti od HT, a bi to z gotovostjo lahko trdili ob ponovitvi poskusa z več HT in z več koncentracijami.

Likarbazepin je aktivni metabolit okskarbazepina. Njuni polarosti sta si zelo podobni, zato smo naše vrednosti K primerjali z vrednostmi za okskarbazepin iz literature. Iz tabele lahko opazimo, da so vrednosti med seboj zelo primerljive. Tudi pri LiCBZ smo opazili večje odstopanje pri primerjavi izračunanih in izmerjenih vrednosti plazemskih koncentracij pri HT 0,6, ko smo za izračune uporabili vrednosti K iz meritev pri HT 0,2. Znova se torej pojavi odvisnost K od hematokrita.

Pri PHT se naše vrednosti precej razlikujejo od vrednosti iz literature. Kljub temu smo s povprečno vrednostjo K pri izračunanih plazemskih koncentracijah dobili zelo dobro ujemanje z izmerjenimi koncentracijami, saj so bile vse vrednosti znotraj 5 %. Pri PHT nismo opazili nobene odvisnosti vrednosti K od koncentracije in hematokrita.

Vrednost K za LTG je pri naših meritvah skladna z literaturo in primerna za preračunavanje plazemskih koncentracij iz izmerjenih koncentracij v DBS. Znova pa smo pri vrednosti HT 0,6 opazili boljšo skladnost plazemskih koncentracij, ko smo za izračune uporabili vrednosti K iz HT 0,6.

Zonisamid se od ostalih preučevanih učinkovin razlikuje po svoji afiniteti do porazdeljevanja v krvne celice, ki se pri določeni koncentraciji nasitijo, zato je koeficient porazdeljevanja v primeru zonisamida spremenljiv. Do razlik pride že pri dodatku minimalne terapevtske koncentracije h krvnim vzorcem nizkega in visokega HT. Pri HT 0,2 je vrednost K precej nižja kot pri HT 0,6, kar pomeni da pri nizkem HT do nasičenja pride že ob dodatku najnižje koncentracije. Ko primerjamo vrednosti K pri nizki in visoki koncentraciji pa so razlike še večje. Pri zonisamidu za pretvorbo koncentracij iz DBS v plazemske ne moremo uporabiti enotnega koeficienta porazdeljevanja.

Največji problem našega poskusa določitve koeficientov K in R, je majhno število vzorcev z različnimi koncentracijami in HT. Kljub temu, da se vrednosti koeficientov pri nekaterih analitih jasno nakazujejo, bi bilo potrebno za potrditev naših ugotovitev, poskus ponoviti z vsaj še enim dodatnim HT (0,4) in vsaj eno dodatno koncentracijo med minimalnim in maksimalnim referenčnim intervalom.

7 SKLEP

Namen magistrske naloge je bil izdelava protokola za določanje porazdelitvenih koeficientov učinkovin oz. metabolitov med krvnimi celicami in plazmo. Za čim bolj točno določitev le-teh je bilo potrebno pripraviti obogatene krvne vzorce z različnimi vrednostmi HT. Pri tem smo spremljali še vrednosti hemolize, saj razpad določenega deleža celic lahko vpliva na koncentracije učinkovin v plazmi.

Pri primerjavi dveh postopkov priprave krvi z določenimi vrednostmi HT smo ugotovili, da je postopek dodajanja in odvzemanja plazme ob predhodno poznanem HT podal bistveno bolj skladne rezultate v primerjavi s teoretično vrednostjo kot postopek pipetiranja krvnih celic in plazme. Poleg tega, je prvi postopek optimalnejši tudi iz stališča postoka priprave (izognemo se pipetiranju viskoznih celic). Težava je edino ta, da je potrebno pred postopkom določiti vrednost HT začetne krvi, za kar potrebujemo hematološki analizator. Ob vrednotenju vpliva časa inkubacije na točnost meritev HT in na hemolizo, nismo zaznali razlik tekom časa do 120 minut. Rezultati primerjav dodatka topila (AcN in MeOH) h krvnim vzorcem so pokazali, da AcN v deležih 3 % in 5 % in MeOH pri 5 % že povzročita hemolizo. Za varno mejo smo tako določili dodajanje MeOH v 3 % glede na končni volumen krvnega vzorca. Možnosti za nastanek hemolize smo še dodatno zmanjšali s pripravo analitov v raztopini MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v). Ovrednotili smo tudi vpliv dodatka učinkovin VPA in CBZ h krvnim vzorcem v najvišji terapevtski koncentraciji. Učinkovini smo dodali v 3 % topila, da bi izničili hemolizo, ki bi jo povzročilo topilo. Pri omenjenih koncentracijah učinkovini še nista povzročili višje hemolize kot kontrolna skupina. Da učinkovini vseeno vplivata na hemolizo, smo dokazali z različnimi vrednostmi HT. Pri najnižjem HT (0,2), kjer na eno krvno celico vpliva največ molekul učinkovine, je bila hemoliza značilno večja, kot pri ostalih dveh vrednosti HT (0,4 in 0,6). Za posredno določevanje hemolize smo optimizirali metodo spektrofotometrične meritve hemoglobina v plazmi, ki je zaradi majhnega volumna analiziranega vzorca, hitrosti in nizke meje spodnje določljivosti primerna za nadaljnjo validacijo in uporabo za določanje hemolize v plazemskih vzorcih.

Pri določanju časa inkubacije analita v krvi za vzpostavitev ravnotežja učinkovin med krvnimi celicami in plazmo smo ugotovili, da do ravnotežja pri preiskovanih spojinah pride relativno hitro, v nekaj minutah. Ker smo pri zgornjem poskusu dokazali, da v obravnavanih

časovnih točkah inkubacije še ne pride do hemolize, smo (da bi zagotovili dovolj časa za vzpostavitev ravnotežja) vzorce inkubirali eno uro.

Postopek smo preizkusili pri določitvi koeficientov K in R pri učinkovinah CBZ, PHT, ZON in LTG ter pri metabolitih LiCBZ in EpoCBZ. Pri CBZ, LiCBZ, LTG in delno tudi pri ZON smo dobili dobro ujemanje med vrednostmi določenih koeficientov in literaturnimi vrednostmi. K in R pri učinkovinah CBZ in PHT nista kazala odvisnosti od koncentracije in hematokrita. Rahlo odvisnost koeficientov od HT smo zaznali pri LiCBZ, EpoCBZ in LTG. Pri ZON pa je odvisnost koeficientov od HT in koncentracije očitna, saj se pri višji koncentraciji in nižjem HT pojavi nasičenost celic z učinkovino.

8 LITERATURA

- 1 Decosterd L.A, Widmer N, André P, Aouri M, Buclin T. The emerging role of multiplex tandem mass spectrometry analysis for therapeutic drug monitoring and personalized medicine. *Trends in Analytical Chemistry* 2016; article in press
- 2 Ghiculescu RA. Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. *Australian Prescriber* 2008; 31 (2)
- 3 Dasgupta A: Introduction to Therapeutic Drug Monitoring. In: *Therapeutic Drug Monitoring: Newer Drugs and Biomarkers*, Elsevier Inc, Houston, 2012; 1-11.
- 4 Kang J, Lee M. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J Intern Med.* 2009; 24: 1-10.
- 5 Adaway J, Keevil B. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography* 2012; 883-884: 33-49
- 6 Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs by Use of Saliva. *Ther Drug Monit* 2013; 35 (1): 4-29
- 7 Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, et al. Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2008; 49 (7): 1239-1276.
- 8 Petre M, Strah A. Spremljanje plazemskih koncentracij antiepileptikov. *Farmaceutski vestnik* 2015; 66: 35-41
- 9 Huang H, Zhou H, Wang N. Recent Advances in Epilepsy Management. *Cell Biochem Biophys* 2015; 73 (1): 7-10
- 10 Krasowski M: Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications, *Pharmaceuticals*, 2010; 3: 1909-35.
- 11 Krasowski M. Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Generation Drugs. *Clinical Laboratory News* 2013
- 12 Milosheska D, Grabnar I, Vovk T. Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 75: 25-39.

- 13 Lehmann S, Delaby C, Vialaret J, Ducos J, Hirtz C. Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med.* 2013; 51(10): 1897-1909.
- 14 Wagner M, Tonoli D, Varesio E, Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrom Rev* 2016; 35(3): 361-438
- 15 Sharma A, Jaiswal S, Shukla M, et al. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Testing and Analysis* 2014; 6 (5): 399-414.
- 16 McDade T: Development and validation of assay protocols for use with dried blood spots samples. *American journal of human biology*, 2014; 26: 1-9.
- 17 Wilhelm A, Burger J, Swart E. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin Pharmacokinet.* 2014; 53: 961-973
- 18 Lehmann S, Delaby C, Vialaret J, Ducos J, Hirtz C. Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med.* 2013; 51(10): 1897-1909.
- 19 Timmerman P, White S, Cobb Z, et al. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013; 5 (17): 2129-2136.
- 20 Cobb Z, de Vries R, Spooner N, Williams S, Staelens L, Doig M, Broadhurst R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, Verheij E, van Baar B, White S, Timmerman P. In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013; 5 (17): 2161-2169
- 21 Spooner N, Denniff P, Michielsen L, et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* 2015; 7 (6): 653-659.
- 22 Emmons G, Rowland M: Pharmacokinetics considerations as to when to use dried spot sampling, *Bioanalysis*, 2010; 2 (11): 1791-1796
- 23 Kong ST, Lim S-H, Lee WB, Kumar PK, Wang HYS, Ng YLS, et al. Clinical Validation and Implications of Dried Blood Spot Sampling of Carbamazepine, Valproic Acid and Phenytoin in Patients with Epilepsy. *PLoS ONE.* 2014;9(9): e108190.
- 24 Medline <https://medlineplus.gov/ency/article/003646.htm> Dostopano: 10. 10. 2016

- 25 De Vries R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, Verheij E, van Baar B, Cobb Z, Timmerman P: The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis*, 2013; 5(17): 2147-2160.
- 26 Koster R. What is the right blood hematocrit preparation procedure for standards and quality control samples for dried blood spot analysis? *Bioanalysis* 2015; 7(3): 345-351
- 27 *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition.
- 28 Capiu S, Stove V, Lambert W, Stove C. Prediction of the hematocrit of dried blood spot via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Analytical Chemistry* 2013; 85: 404-410.
- 29 Soweminmo-Coker S. Red blood cell hemolysis during processing- *Transfusion Medicine Review* 2002; 16 (1): 46-60
- 30 Milutinović D, Andrijević I, Ličina M, Andrijević L. Confidence level in venipuncture and knowledge on causes of in vitro hemolysis among healthcare professionals. *Biochemia Medica*. 2015;25(3):401-409.
- 31 Milosheska D. Klinična farmakokinetika lamotrigina, okskarbazepina in topiramata pri bolnikih z epilepsijo. Doktorska disertacija, 2016.
- 32 Mikelj M. Razvoj in validacija analizne metode za ugotavljanje koncentracij okskarbazepina, karbamazepina in njihovih metabolitov v posušeni krvni madežih. Magistrska naloga, 2015
- 33 Frenchik MD, McFaul SJ, Tsonev LI. A microplate assay for the determination of hemoglobine concentration. *Clinica Chimica Acta*. 2004; 339:199-201
- 34 Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens: Chapter 1:Blood and the cells it contains. National Center for Biotechnology Information. US, 2005
- 35 Sonmez M, Ince HY, Yalcin O, Ajdžanović V, Spasojević I, Meiselman HJ, et al. (2013) The Effect of Alcohols on Red Blood Cell Mechanical Properties and Membrane Fluidity Depends on Their Molecular Size. *PLoS ONE* 8(9): e76579.
- 36 Shah NM, Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013; 923-924:65-73
- 37 Venzon Antunes M, Charão M, Linden R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clinical Biochemistry*. 2016; 49(13-14): 1035-1046

- 38 Ficarra S1, Misiti F, Russo A, Carelli-Alinovi C, Bellocco E, Barreca D, Laganà G, Leuzzi U, Toscano G, Giardina B, Galtieri A, Tellone E. Antiepileptic carbamazepine drug treatment induces alteration of membrane in red blood cells: possible positive effects on metabolism and oxidative stress. *Biochemie*. 2013. 95(4):833-41
- 39 Ozkara C, Dreifuss FE, Apperson Hansen C. Changes in red blood cells with valproate therapy. *Acta Neurol Scand*. 1993;88(3):210-2
- 40 Franko N. Proučevanje vpliva protiepileptičnih učinkovin prve in druge generacije na nastanek oksidativnega stresa na celicah thp-1. Magistrska naloga, 2015.